Lei 30

...AICU
...GHEL
...ONICA STOIAN
...DINA DUMA
ELENA TAISESCU
ELENA BADEA
LILIANA GREGORIAN

...ENETICA

metode de laborator

EDITURA ACADEMIEI
...EPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

P. RAICU, I. ANGHEL, VERONICA STOIAN, DOINA DUMA,
ELENA TAISESCU, ELENA BADEA, LILIANA GREGORIAN

GENETICA
METODE DE LABORATOR

Mircel
Florica
28 Nov. 1984
Cluj-Napoca

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
1983

Genetics. Laboratory Methods

Генетика. Лабораторные методы

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R 79717, București, Calea Victoriei 125

CUPRINS

CUVÎNT ÎNAINTE 9

1. SINCRONIZAREA DIVIZIUNII CELULARE. DURATA CICLULUI MITOTIC ȘI A MEIOZEI. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A ADN PRIN MICROFOTOMETRIE 13

1.1. Sincronizarea diviziunii celulare și determinarea duratei ciclului mitotic în meristemele radiculare 16
1.1.1. Metoda populațiilor sincrone de celule $4n$ 16
1.1.2. Metoda de sincronizare a diviziunii unei populații celulare cu 5-aminouracil 17
1.1.3. Metode microautoradiografice de determinare a duratei ciclului mitotic 18
1.1.4. Determinarea lungimii ciclului mitotic prin inhibarea formării plăcii ecuatoriale 21
1.2. Sincronizarea diviziunii celulare și determinarea duratei ciclului mitotic în culturi de celule vegetale 22
1.2.1. Sincronizarea parțială a diviziunii celulare în culturi celulare în suspensie 22
1.2.2. Durata ciclului mitotic în culturi de celule vegetale 24
1.3. Determinarea duratei meiozei la plantele superioare 25
1.3.1. Durata meiozei în celulele-mamă polinice 25
1.3.2. Durata meiozei determinată prin marcare cu timidină tritiată 28
1.3.3. Durata meiozei în celulele-mamă ale sacului embrionar 30
1.4. Sincronizarea diviziunii celulare și determinarea duratei ciclului mitotic în culturi de celule animale 32
1.4.1. Metoda de sincronizare a diviziunii celulare cu 5-aminouracil 32
1.4.2. Metodă pentru determinarea lungimii ciclului mitotic prin marcare cu timidină tritiată 33
1.5. Determinarea duratei meiozei la mamifere 34
1.6. Determinarea cantitativă a ADN prin microfotometrie 39
1.6.1. Identificarea ADN prin reacția Feulgen 39
1.6.2. Determinarea cantitativă a ADN 41

2. METODE PENTRU STUDIUL CROMOZOMILOR LA PLANTE 46

2.1. Metode pentru evidențierea cromozomilor în mitoză 46
2.1.1. Metoda de includere în parafină, secționare și colorare a cromozomilor 46
2.1.2. Metoda Feulgen de colorare a cromozomilor pe preparate squash . . . 49
2.1.3. Cîteva recomandări pentru speciile cu cromozomi mici și greu colorabili 51
2.2. Metode pentru evidențierea cromozomilor în meioză 52
2.2.1. Metoda carmin acetică 52
2.2.2. Metoda Feulgen 52
2.3. Tehnici pentru realizarea de preparate semipermanente și permanente . . . 53
2.4. Metode de bandare 54
2.4.1. Metode de bandare Q (benzi Q) 55
2.4.2. Metode de bandare C (benzi C) 57
2.4.3. Bandarea cu Giemsa a cromozomilor meiotici 60

2.4.4. Metode de evidențiere a centromerilor 60
2.4.5. Metoda de evidențiere a kinetocorilor în meioză (benzi Cd) 62
2.4.6. Metoda de bandare N (benzi N) 62
2.4.7. Metoda de bandare T (benzi T) 63
2.4.8. Evidențierea heterocromatinei centromerice și telomerice cu ajutorul extensilinei 64
2.4.9. Metoda de colorare diferențiată după tratamentul cu acid clorhidric (benzi Hy) 64
2.5. Evidențierea structurii spiralizate a cromozomilor 65
2.6. Metoda de izolare a cromozomilor metafazici 65

3. METODE PENTRU STUDIUL CROMOZOMILOR LA ANIMALE 67

3.1. Metode pentru studiul cromozomilor în mitoză 69
3.1.1. Metode pentru studiul cromozomilor la pești 69
3.1.2. Metode pentru studiul cromozomilor la amfibieni 74
3.1.3. Metode pentru evidențierea cromozomilor la reptile 75
3.1.4. Metode pentru studiul cromozomilor la păsări 77
3.1.5. Metode pentru studiul cromozomilor la mamifere 80
— Evidențierea cromozomilor în măduva osoasă 80
— Evidențierea cromozomilor în sîngele periferic 83
— Evidențierea cromozomilor în culturi de sînge total 84
— Evidențierea cromozomilor în culturi de lecucocite 85
— Evidențierea cromozomilor în culturi de țesuturi 87
— Evidențierea cromozomilor în tumori solide 89
— Evidențierea directă a cromozomilor în țesuturi embrionare 90
— Evidențierea cromozomilor în celule din lichidul amniotic 90
3.2. Metode pentru studiul cromozomilor în meioză 92
3.2.1. Metode pentru studiul cromozomilor la pești 92
3.2.2. Metode pentru evidențierea cromozomilor la amfibieni 93
3.2.3. Metode pentru evidențierea cromozomilor la păsări 94
3.2.4. Metode pentru studiul cromozomilor la mamifere 94
3.3. Metode de evidențiere a benzilor cromozomiale 96
3.3.1. Metode de bandare Q 96
3.3.2. Metode de bandare C 98
3.3.3. Metode de bandare G 100
3.3.4. Metode de bandare R și T 103
3.3.5. Metode de bandare a cromozomilor meiotici 104
3.3.6. Studiul structurii cromozomilor prin pretratament cu 5-bromdezoxiuridină, actinomicină D și acridinorange 106
3.4. Metoda autoradiografică pentru studiul cromozomilor 106
3.5. Metode pentru studiul cromozomilor sexului în nucleii interfazici 109
3.5.1. Evidențierea cromatinei X 109
3.5.2. Evidențierea drumstick-ului 110
3.5.3. Evidențierea cromatinei Y 111

4. CARIOTIPUL ȘI STANDARDIZAREA SA 112

4.1. Identificarea cromozomilor și alcătuirea cariotipului 112
4.2. Cariotipul uman normal 116
4.2.1. Caracterizarea generală a cromozomilor mitotici umani 117
4.2.2. Modele de bandare a cromozomilor umani 119
4.3. Cariotipul la cîteva specii de mamifere 123
4.4. Cariotipul la cîteva specii de plante 129

5. METODE DE CREȘTERE, STUDIU CITOGENETIC ȘI ANALIZĂ GENETICĂ LA *DROSOPHILA MELANOGASTER* 134

5.1. Metoda de creștere în laborator 135
5.2. Metode pentru studiul cromozomilor mitotici 138
5.3. Metode pentru studiul cromozomilor uriași 139

5.4. Principalele mutante și linii folosite în studiile de genetică 142
5.5. Analiza genetică 144
5.5.1. Monohibridarea 144
5.5.2. Retroîncrucișarea (back-cross) 145
5.5.3. Dihibridarea 145
5.5.4. Încrucișări trihibride 146
5.6. Interpretarea matematică a rezultatelor încrucișărilor experimentale . . . 147
5.7. Evidențierea fenomenului de înlănțuire a genelor (linkage) 148
5.8. Evidențierea fenomenului de interacțiune a genelor 148
5.9. Evidențierea fenomenului de crossing-over 150
5.10. Evidențierea fenomenului de sex-linkage 151

6. METODE DE INDUCERE ȘI DE IDENTIFICARE A MUTAȚIILOR 152

6.1. Metode de inducere a mutațiilor la microorganisme 153
6.2. Metode de identificare a mutațiilor la microorganisme 161
6.2.1. Metoda dispersiei 161
6.2.2. Metoda replicii 161
6.3.3. Metoda fluctuației 163
6.2.4. Metode de izolare a mutantelor biochimice 164
6.3. Metode de inducere a mutațiilor la plante 166
6.4. Metode de identificare a mutațiilor la plante 172
6.4.1. Identificarea mutațiilor recesive în polen, endosperm și la plantele haploide 172
6.4.2. Identificarea mutațiilor la plantele autogame 174
6.4.3. Identificarea mutațiilor la plantele alogame 175
6.4.4. Identificarea mutațiilor la plantele poliploide 175
6.5. Metode de inducere și de identificare a mutațiilor la *Drosophila melanogaster* 178
6.5.1. Metode non-disjuncției cromozomilor X 179
6.5.2. Metoda ClB 179
6.5.3. Metoda Muller-5 180
6.5.4. Metodele Basc și Maxy pentru identificarea mutațiilor punctiforme . . 181
6.5.5. Metoda genelor letale balansate 183
6.6. Metode de identificare a mutațiilor la mamifere 184
6.6.1. Metoda locusului specific 184
6.6.2. Metoda iradierii embrionilor heterozigoți 185

7. METODE DE TESTARE A POTENȚIALULUI MUTAGEN AL DIFERITELOR SUBSTANȚE CHIMICE LA MAMIFERE ȘI PLANTE 186

7.1. Teste pentru mutageneză utilizate la mamifere 187
7.1.1. Testul culturilor celulare 188
7.1.2. Testul letalelor dominante (DL-test) 189
7.1.3. Analiza citogenetică în mitoză 190
7.1.4. Testul micronucleilor 192
7.1.5. Testul schimburilor între cromatidele-surori (SCE) 193
7.1.6. Analiza citogenetică în meioză 196
7.2. Teste pentru mutageneză utilizate la plantele superioare 198
7.2.1. Testul aberațiilor cromozomiale 198
7.2.2. Testul schimburilor între cromatidele-surori (SCE) 201

8. METODE PENTRU INDUCEREA POLIPLOIDIEI LA PLANTE ȘI ANIMALE. DETERMINAREA GRADULUI DE PLOIDIE 204

8.1. Metode pentru inducerea poliploidiei la plante 204
8.1.1. Metode biologice 205
8.1.2. Metode fizice 206
8.1.3. Metode chimice 207

8.2. Metode indirecte de determinare a gradului de ploidie la plante 218
8.3. Metode pentru inducerea de poliploizi la ciuperci 224
8.4. Metode pentru inducerea poliploidiei la animale 225

9. CULTURI DE CELULE ȘI ȚESUTURI VEGETALE. INDUCEREA ANDROGENEZEI 228

9.1. Tehnica de cultură *in vitro* a celulelor și țesuturilor vegetale 230
9.1.1. Mediul de cultură 230
9.1.2. Materialul vegetal 236
9.2. Regenerarea de plante în culturi de celule și țesuturi 238
9.2.1. Inducerea și creșterea calusului 238
9.2.2. Diferențierea calusului în cultură 239
9.3. Tehnici de obținere a plantelor haploide și a liniilor izogene 241
9.3.1. Tehnici de cultură a anterelor 241
9.3.2. Tehnica de izolare și cultură a microsporilor 242
9.3.3. Diploidizarea plantelor haploi de 246
9.3.4. Obținerea plantelor haploide și liniilor izogene la tutun 248

10. METODE DE IZOLARE ȘI CULTURĂ A PROTOPLAȘTILOR 251

10.1. Metode de izolare a protoplaștilor 251
10.2. Metode de cultură a protoplaștilor 253
10.2.1. Condițiile necesare pentru realizarea culturilor 254
10.2.2. Cultura protoplaștilor și regenerarea de plante 256
10.3. Izolarea protoplaștilor din frunze 257
10.4. Izolarea protoplaștilor din suspensii celulare 258
10.5. Izolarea protoplaștilor din polen 259
10.6. Izolarea și cultura protoplaștilor la *Nicotiana tabacum* 259

11. METODE DR HIBRIDARE CELULARĂ 264

11.1. Hibridarea celulară la plante prin fuziune de protoplaști 267
11.1.1. Metode de inducere a fuzionării protoplaștilor 268
11.1.2. Identificarea protoplaștilor fuzionați și a hibrizilor somatici 274
11.2. Hibridarea celulară la animale 278
11.2.1. Determinarea frecvenței celulelor fuzionate 283
11.2.2. Izolarea și selecția hibrizilor somatici 284

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ 292

CONTENTS 301

CUVÎNT ÎNAINTE

Redescoperirea legilor mendeliene, în anul 1900, a însemnat apariția geneticii, una dintre cele mai fascinante științe biologice, cu o dezvoltare ulterioară de-a dreptul uluitoare. Iată cîteva momente care au marcat evoluția geneticii și în special a citogeneticii în secolul nostru.

În 1902—1903, Sutton și Boveri elaborează ipoteza conform căreia factorii ereditari mendelieni, se găsesc plasați în cromozomi, punîndu-se astfel bazele teoriei cromozomiale a eredității. Folosirea insectei Drosophila melanogaster, pentru realizarea analizei genetice și pentru întocmirea hărților cromozomiale, a însemnat un mare progres pentru genetică.

În 1924, Feulgen demonstrează, cu ajutorul tehnicii de colorare devenită celebră, că în cromozomi este localizat ADN, al cărui rol genetic a fost evidențiat direct abia în 1944 de către Avery, McCarty și McLeod, iar structura sa moleculară în 1953 de către Watson, Crick și Wilkins.

Descoperirile majore din domeniul biologiei moleculare după cel de-al doilea război mondial au impulsionat studiul cromozomilor. Citogenetica moleculară, folosind o gamă largă de metode și tehnici de mare finețe și profunzime, a adus un plus de informație, în special privind structura și funcțiile materialului genetic, precum și asupra arhitecturii moleculare a cromozomilor.

Este interesant de remarcat că și tehnicile de laborator pentru studiul materialului genetic au avut o evoluție extrem de rapidă. Pînă în 1921, cromozomii se studiau numai cu ajutorul secțiunilor în parafină, fapt care nu permitea o individualizare a lor. Este meritul lui Belling de a fi elaborat tehnica squash *(1921) prin care se pot realiza dispersarea și identificarea cromozomilor.* Utilizarea colchicinei *(Blakeslee și Avery, 1937; Levan, 1938), un alcaloid extras din bulbii plantei Colchicum autumnale pentru blocarea diviziunii celulare în metafază, a dus la obținerea unui număr mare de celule în diviziune și la inducerea experimentală a poliploidiei, în special la plante.*

Pentru citogenetica animală și umană, un alt moment de mare semnificație l-a constituit descoperirea pretratamentului cu soluție hipotonă *de către Hsu, în 1952, care permite o dispersare perfectă a cromozomilor și o analiză de mare finețe a complementului cromozomial. În 1953 se adaugă o nouă* metodă de realizare a frotiurilor prin uscare la aer sau flacără, *elaborată de Conger și Fairchild.*

Pentru citogenetica umană, importanță deosebită a avut descoperirea lui Barr și Bertram (1949) privind evidențierea cromatinei sexuale *în nucleii celulelor femelelor de la mamifere, și absența sa la masculi, ceea ce a permis evidențierea rapidă a sexului genetic.*

Cea mai spectaculoasă descoperire a fost, fără îndoială, identificarea exactă a numărului de cromozomi mitotici umani (2n = 46), *de către Tjio*

și Levan (1956), și a 23 de bivalenți în spermatocitele umane, de către Ford și Hamerton, în același an.

Tehnica fuzionării celulelor animale in vitro, *elaborată de Barski, Sorieul și Cornefert (1960), precum și* folosirea virusului Sendai inactivat cu radiații UV *(Harris și Watkins, 1965) pentru mărirea frecvenței fuzionării au creat premise pentru elaborarea mai rapidă de hărți genetice. Metoda se bazează pe eliminarea preferențială și treptată în generațiile ulterioare de cultură celulară a cromozomilor unui genitor, astfel că genele pot fi localizate relativ ușor pe cromozomul neeliminat.*

Cultura de celule și țesuturi vegetale *a contribuit, de asemenea, la dezvoltarea geneticii, în special a ingineriei genetice. În această direcție merită menționată elaborarea unor* tehnici de inducere a haploidiei prin androgeneză experimentală, *bazate pe cercetările lui Guha și Maheswari (1964) privind dezvoltarea de embrioni din microspori în cultura de antere și pe studiile lui Bourgin și Nitsch (1967), care au obținut plante haploide dezvoltate complet la tutun.*

La plante s-a pus la punct tehnica hibridării celulare prin fuzionarea protoplaștilor, *devenind posibilă obținerea de amfidiploizi pe cale parasexuală. Primul hibrid interspecific în cadrul genului* Nicotiana *a fost realizat cu ajutorul acestei tehnici de către Carlson, Smith și Dearing (1972).*

Tehnica fuzionării celulare a făcut posibilă vizionarea cromozomilor interfazici. Johnson și Rao (1970) au reușit să elaboreze metoda condensării premature a cromozomilor, *care se bazează pe fuzionarea între celule în diviziune și celule în interfază (G_1,S,G_2). S-au putut astfel viziona cromozomii interfazici nu numai în celulele somatice, dar chiar în spermatozoizi.*

Metodele de bandare *reprezintă un mare progres în studiile de citogenetică. Primele observații le-au făcut Caspersson, Zech, Modest, Foley și Wagh (1969) pornind de la faptul că mulți fluorocromi pot colora cromozomii, care la microscopia în UV prezintă fluorescență. Prin atașarea unui agent alkilant de molecula de fluorocrom, acesta se leagă preferențial de perechile de nucleotide guanină — citozină. Regiunile cromozomiale bogate în G—C devin astfel puternic fluorescente, comparativ cu restul cromozomului. Așa a apărut* metoda de bandare Q, *în care se folosește quinacrina pentru obținerea unei fluorescențe diferențiate. Mai mult, s-a demonstrat că pe cromozomul Y uman există un segment distal pe brațul lung care prezintă o puternică fluorescență, chiar în interfază. Se poate astfel detecta sexul celulelor umane în interfază, prin* prezența sau absența cromatinei Y fluorescentă. *Ulterior, Hilwig și Gropp (1972) au constatat că un derivat al dibenzimidazolului, cunoscut sub denumirea Hoechst 33258, are proprietăți similare quinacrinei, dar mai stabile. Pe această bază, Latt (1973) a elaborat* tehnica colorării diferențiate a cromatidelor, *prin care se pot diferenția schimburile între cromatidele-surori. În ultimii ani au fost elaborate și alte metode de bandare cromozomială. Astfel, pe baza existenței unor secvențe repetitive de nucleotide în genomul eucariotelor s-a elaborat tehnica denaturării — renaturării preferențiale a segmentelor respective și a colorării lor diferențiale. Așa a apărut* tehnica de bandare C, *prin care este colorată preferențial heterocromatina constitutivă, plasată la mamifere de obicei în regiunea centromerică. Din această tehnică a rezultat ulterior* bandarea G, *în care se folosește soluția Giemsa, elaborată de Gustav Giemsa pentru evidențierea malariei în preparate de sînge. Bandarea G prezintă avantajul*

că este permanentă, nu necesită microscopie în UV și se obțin benzi mai multe și mai fine decît în cazul bandării C. Benzile G intens colorate indică prezența unor segmente cromozomiale bogate în secvențe de nucleotide adenină — timină. S-au mai elaborat și metode de bandare R, *exact viceversa decît cele G,* de bandare T, *pentru evidențierea telomerelor,* de bandare N, *pentru evidențierea organizatorului nucleolar etc.*

Progresele înregistrate în citogenetică au dus și la o standardizare a complementului cromozomial de la diferite specii, *studiat cu ajutorul diverselor metode de bandare. Cel mai ilustrativ exemplu se referă la cromozomii umani. Dacă în 1960, la Conferința de la Denver, cromozomii umani au fost împărțiți în 7 grupe, notate cu primele litere mari ale alfabetului, deoarece în interiorul fiecărui grup cromozomii nu puteau fi identificați cu precizie, la conferințele de la Londra (1963), Chicago (1966), Paris (1971 și 1975) s-a ajuns la o caracterizare detaliată a fiecărui cromozom uman. Evident că aceasta are implicații profunde nu numai în studiile fundamentale de citogenetică, dar și în cele cu caracter clinic.*

Genetica modernă beneficiază de o multitudine de tehnici de mare finețe și eficiență pentru inducerea de mutații și identificarea lor. De asemenea au fost elaborate mai multe teste pentru determinarea potențialului mutagen al unor factori din mediul înconjurător, fapt de mare semnificație pentru protecția ecosistemelor din natură.

Lucrarea de față cuprinde o sinteză a metodelor și tehnicilor de bază folosite în studiile de genetică clasică și modernă. În mare măsură, această sinteză este rezultatul experienței proprii a colectivului de autori. Sperăm că am realizat o carte utilă tuturor celor care se ocupă cu studiile de genetică vegetală, animală sau umană.

Prof. dr. doc. PETRE RAICU

1 Sincronizarea diviziunii celulare. Durata ciclului mitotic și a meiozei. Determinarea cantitativă a ADN prin microfotometrie

În celulele în curs de diviziune au loc fenomene ciclice care duc la transformarea, în intervale mai mult sau mai puțin regulate, a unei celule-mamă în două celule-fiice. Succesiunea acestor fenomene poartă denumirea de ciclu celular sau ciclu mitotic (fig. 1). Aceasta este caracteristica fundamentală a tuturor organismelor vii. Înainte însă de diviziune, toate celulele trec în mod necesar printr-un stadiu de creștere, care la nivel de organism corespunde perioadei de tinerețe a materiei vii, de construire a organismelor pluricelulare; la nivel celular, în cazul unor țesuturi reproducătoare, meristeme de creștere și al organismelor unicelulare stările de creștere și de diviziune sînt permanente.

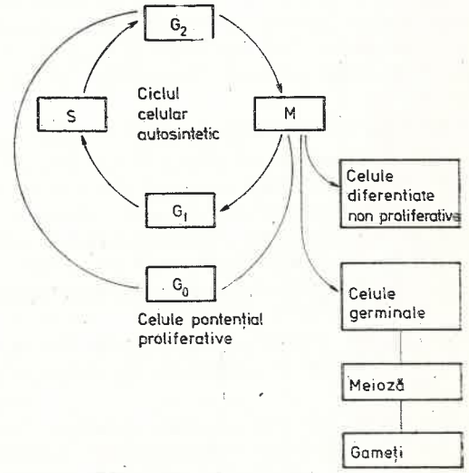


Fig. 1. — Schema ciclului mitotic.

Ciclul celular are două faze principale, totdeauna tranzitorii: de sinteză a ADN nuclear (S) și mitoza (M), și două faze intermediare: presintetică (G_1) și premitotică (G_2). Se poate defini și un stadiu G_0 care corespunde unei etape de oprire sau de așteptare a celulei în faza G_1 sau G_2.

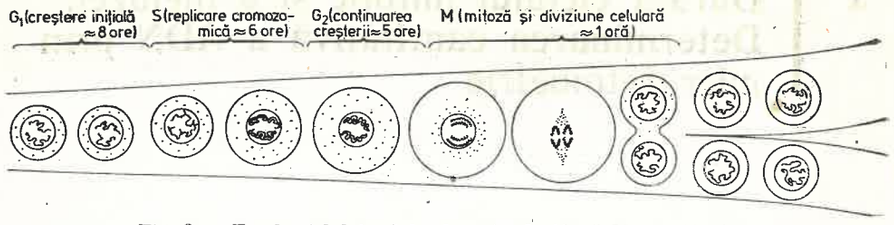


Fig. 2. — Fazele ciclului celular la animale (după Mazia, 1974).

La mamifere, ciclul celular (fig. 2) începe cu prima şi cea mai lungă dintre fazele de creştere, faza G_1, care poate să dureze 6—8 ore sau mai mult. Cînd celula începe sinteza de ADN, ea intră în cea de-a doua fază de creştere, faza S, care durează aproximativ 6 ore şi în care materialul genetic se replică. După replicaţie celula intră în faza G_2, în care deşi mărimea celulei se dublează, în aproximativ 5 ore, cantitatea de material genetic rămîne constantă. Celula este astfel pregătită pentru a intra în mitoză. În această fază, cromozomii se condensează şi devin vizibili, membrana nucleară dispare şi are loc asamblarea aparatului mitotic. Cromozomii se deplasează la poli în număr egal, celula se împarte în două celule-fiice identice, care, la rîndul lor, încep un alt ciclu celular.

La cele mai multe plante şi animale, în condiţii normale de nutriţie şi temperatură, un ciclu mitotic este completat în 24 de ore sau chiar mai puţin. De exemplu, din cele 20 de ore ale unui ciclu mitotic tipic, aproximativ 1—2 reprezintă mitoza (diviziunea propriu-zisă), restul fiind interfază (G_1, S, G_2). În condiţii de laborator, unele linii de celule animale parcurg ciclul mitotic în 10 ore, iar organismele unicelulare (drojdiile şi unele protozoare) au un ciclu şi mai scurt (de ex., protozoarul *Tetrahymena*, 150—180 minute, bacteriile şi unele organisme procariote, 20 minute).

Durata ciclului celular este o caracteristică a fiecărui tip de celulă şi a fiecărei specii şi nu poate fi modificată decît în condiţii deosebite de nutriţie şi temperatură care au efect puternic (tabelul nr. 1).

Variaţii extreme ale duratei ciclului celular se înregistrează în cursul diferenţierii ţesuturilor. De exemplu, în celulele iniţiale ale caliptrei faza G_1 dispare, iar fazele S, G_2 şi M au o durată maximă, în timp ce în zona liniştită, G_1 durează 151 ore. De asemenea, în cursul embriogenezei la animale şi în diferite ţesuturi la o anumită specie, fenomenul este la fel de frapant. La şoarece, de exemplu, durata totală a ciclului mitotic este de 13 ore în intestinul subţire, de 71 ore în glandele mamare şi de 113 ore în esofag.

Controlul duratei fazelor ciclului mitotic constituie un element important în organizarea ţesuturilor. Cercetările privind influenţa diferiţilor factori sau substanţe chimice asupra ciclului mitotic pot duce la înţelegerea rolului acestui fenomen în ontogeneză şi diferenţiere. Dar, pentru astfel de cercetări este necesară *sincronizarea* populaţiilor celulare, care oferă posibilitatea măsurării lungimii ciclului celular şi a diferitelor faze, precum şi posibilitatea de a lucra pe un număr important de celule care se găsesc în acelaşi stadiu. Metodele folosite pentru sincronizare se

Tabelul nr. 1

Durata ciclului mitotic la diferite specii
(după Essad, 1974)

Materialul studiat	Factorul care influenţează ciclul mitotic	Durata ciclului mitotic total (ore)	G_1	S	G_2	M
Avena pilosa		8,85	0	4,25	2,9	1,7
Allium cepa		12,8	1,5	6,5	2,4	2,3
Hordeum sativum		12,0	2,6	4,9	3,4	1,1
Vicia faba		18,0	5,3	6,0	5,2	1,5
Pisum sativum (3 soiuri)		13—14	4—5	4,5	3—3,3	1,2—1,4
	Poliploidia					
Avena strigosa	2*n*	9,8	2,45	3,55	2,00	1,8
	4*n*	9,9	1,00	3,75	3,55	1,6
	Temperatura					
Tradescantia paludosa	13 °C	51,0	15,4	22,5	8,3	5,1
	21 °C	20,8	5,8	10,9	2,5	1,7
	30 °C	16,0	2,4	9,5	2,4	1,7
	Diferenţierea					
Zea mays	iniţialele caliptrei	15	0	8	5	2
	zona liniştită	174	151	9	11	3
	cilindrul central	22	2	11	7	2
Xenopus laevis	stadiu de clivare	0,25	0	0,17	0,04	0,04
	blastulă	8	2	2	3,5	0,5
	gastrulă	16	3,5	4,5	8,0	0,5
Mus musculus	intestinul subţire	13	5	6	0,9	0,8
	glande mamare	71	45	21	3	1,0

bazează pe oprirea temporară a evoluţiei celulelor într-un anumit moment al ciclului pentru acumularea de celule. Cînd factorul care a oprit diviziunea este eliminat din mediu, celulele continuă ciclul celular toate deodată, cu aceeaşi viteză.

Rezultate satisfăcătoare în sincronizarea diviziunii celulare s-au obţinut la organisme unicelulare (bacterii, protozoare, alge) sau culturi de celule animale şi vegetale prin alternanţa condiţiilor de temperatură, prin nutriţie insuficientă sau prin acţiunea diferitelor substanţe inhibitoare (antimetaboliţi). Dintre inhibitori amintim: fluordezoxiuridina şi excesul de timidină care blochează sinteza ADN, hidroxiureea care blochează diviziunea la sfîrşitul fazei G_1 şi distruge celulele în faza S, colchicina care blochează activitatea fusului nuclear, 5-aminouracilul etc. Procedeele fizice de triere a celulelor în diferite faze ale ciclului celular sînt, de asemenea, folosite în cazul culturilor de celule: se ştie că prin spălarea culturii sînt antrenate celule în mitoză a căror aderenţă la vas este mai redusă decît a celulelor în celelalte faze.

1.1. Sincronizarea diviziunii celulare şi determinarea duratei ciclului mitotic în meristemele radiculare

Meristemele radiculare constituie principalul material pentru studiul duratei ciclului mitotic. Elaborarea modelului ciclului mitotic general acceptat, al lui Howard şi Pelc (1953), s-a bazat pe studii de cinetica populaţiilor celulare, precum şi pe studii de determinare a ciclului mitotic şi a fazelor sale cu ajutorul izotopilor radioactivi în meristeme radiculare.

1.1.1. Metoda populaţiilor sincrone de celule 4*n* (după Van't Hof, Wilson şi Colan, 1960)

Autorii au pornit de la ideea că într-o populaţie mare de celule în diviziune se poate crea cu ajutorul colchicinei o populaţie mică de celule 4*n*; celulele tetraploide astfel marcate, precum şi cele rezultate din diviziunea lor pot fi recunoscute în cursul mai multor cicluri mitotice.

Metoda constă în următoarele:

— Germinarea seminţelor la temperatură constantă (20—23°C).

— Tratarea rădăcinilor jumătate de oră cu o soluţie de colchicină $3{,}76 \times 10^{-4}$ M; concentraţii mai mari sau o perioadă de tratament mai mare reduce gradul de refacere al celulelor.

— Transferul rădăcinilor în apă de robinet.

— Fixarea a cîte 4—5 rădăcini în alcool etilic — acid acetic glacial (3 : 1) din oră în oră, timp de 24—30 de ore.

— Efectuarea de preparate squash colorate Feulgen.

— Determinarea frecvenţei celulelor 4*n* în metafaze la fiecare timp de fixare. Frecvenţa acestor celule se determină folosindu-se indicele poliploid, care reprezintă numărul de celule 4*n* la 100 celule. Timpul dintre două maxime succesive ale indicelui poliploid reprezintă durata ciclului mitotic. La *Pisum sativum* (2*n* = 12), la 22,5°C, durata ciclului mitotic, determinată de autori prin această metodă, este de 12 ore.

Sincronizarea se menţine un număr relativ redus de cicluri mitotice, de obicei 3—4 cicluri, iar după 6 diviziuni se pierde. Pentru cercetări de mare precizie se folosesc numai prima şi a doua diviziune de la marcare.

Această metodă se poate folosi nu numai pentru determinarea lungimii ciclului mitotic în condiţii normale, ci şi sub acţiunea a diverşi factori exogeni care pot provoca prelungirea sau scurtarea intervalului dintre două diviziuni (Raicu şi Stoian, 1967) sau chiar blocarea diviziunii (fig. 3).

La *Vicia faba* (Ronchi, Buiatti şi Ipata, 1967), durata ciclului mitotic, determinată cu ajutorul acestei metode, la 19°C, în condiţii normale este de 16—18 ore, în timp ce sub influenţa trietilenmelaminei, agent alkilant puternic, se prelungeşte la 24 de ore la pH 5 şi la 34 de ore, la pH 6,7.

Există de asemenea o variantă a metodei populaţiilor sincrone de celule 4*n*, care constă în:

— efectuarea unui tratament continuu cu aceeaşi concentraţie de colchicină;

= alcool acetic.

— fixarea rădăcinilor din oră în oră în alcool etilic : acid acetic glacial (3 : 1), timp de 30—40 de ore;

— efectuarea de preparate squash;

— determinarea frecvenţei celulelor 2*n*, 4*n* şi 8*n*.

Durata ciclului mitotic este reprezentată de perioada de timp dintre începutul tratamentului şi apariţia primelor celule 4*n*.

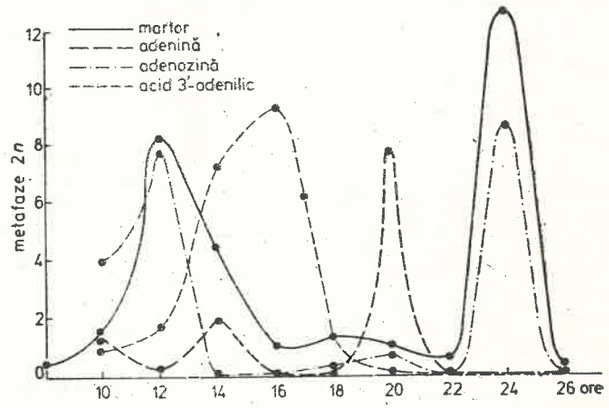


Fig. 3. — Durata ciclului mitotic la *Vicia faba* sub influenţa unor tratamente cu diferite substanţe, determinată prin metoda populaţiilor sincrone de celule 4*n*.

Metoda creării artificiale de populaţii sincrone de celule 4*n* printr-un tratament continuu cu 0,5% colchicină. Prin această metodă se determină frecvenţa metafazelor diploide, tetraploide şi octoploide în rădăcini fixate în alcool etilic — acid acetic glacial (3 : 1) la diferite intervale de timp. Buiatti şi Ronchi (1963), determinînd la *Vicia faba* lungimea ciclului mitotic în condiţii normale (19°C şi întuneric) şi sub influenţa trietilenmelaminei, au constatat că primele celule 4*n* apar la 18 ore de la începutul tratamentului la martor şi la 30 de ore la materialul supus influenţei trietilenmelaminei. După aceste intervale de timp se observă o reducere rapidă a frecvenţei celulelor 2*n* şi o mărire a numărului celor 4*n*. De exemplu, la martor după 30 de ore de la începerea tratamentului frecvenţa celulelor 2*n* este de numai 10%, restul de 90% fiind majoritatea celule 4*n* şi cîteva 8*n*.

1 1.2. Metoda de sincronizare a diviziunii unei populaţii celulare cu 5-aminouracil după Prensky şi Smith, 1965)

Metoda constă în faptul că 5-aminouracilul (5-AU) provoacă blocarea ciclului mitotic la sfîrşitul fazei G_1, astfel încît sinteza ADN nu se mai poate realiza. După eliminarea inhibitorului, toate celulele intră simultan în faza S, apoi în G_2 şi în M, realizîndu-se astfel sincronizarea diviziunii celulare.

Se procedează astfel:

— Germinarea semințelor la temperatură constantă (19—22°C).

— Imersionarea rădăcinilor într-o soluție aerată de 5-AU în concentrație de 500 ppm, 48 de ore.

— Îndepărtarea soluției, spălarea rădăcinilor și transferarea lor în apă de robinet.

— Fixarea în alcool etilic — acid acetic glacial a cîte 4—5 rădăcini, din oră în oră, timp de 35—40 de ore.

— Se efectuează preparate squash, colorate Feulgen și se examinează citofotometric.

Perioada de timp dintre două maxime ale cantității de ADN (2C și 4C) reprezintă durata ciclului mitotic.

Grant (1965) a experimentat pe meristeme de *Hordeum vulgare* și a demonstrat citofotometric că la finele tratamentului toate celulele meristematice radiculare sînt blocate la sfîrșitul fazei G_1, avînd o cantitate de ADN de 2C. După 2—3 ore de la îndepărtarea soluției de 5-AU, celulele reîncep sinteza ADN, iar în 9—12 ore ele ajung în bloc în faza 4C. La 18 ore de la tratament, indicele mitotic a ajuns la 26%, fiind de 4—5 ori mai mare decît la martor, după care frecvența celulelor în diviziune se reduce. La 27 ore de la tratament se observă al doilea maxim al cantității de ADN, pentru ca la 33 de ore să se manifeste al doilea maxim de celule în diviziune, ceva mai redus ca primul. Sincronizarea nu se menține mai departe. La 25°C, ciclul mitotic este mai scurt, cele două maxime ale indicelui mitotic fiind semnalate la 14 și 28 de ore de la tratament.

Această metodă permite nu numai studiul ciclului mitotic, ci face posibilă obținerea unei populații de celule aflate într-o anumită fază de diviziune la un moment dat: profază, metafază, anafază, telofază. În cazul unor cercetări în care se urmărește, de pildă, frecvența aberațiilor într-o anumită fază a diviziunii celulare, metoda creează posibilități de studiu rapid al unui număr mare de celule care pot fi blocate în faza respectivă, datorită diviziunii lor sincrone.

1.1.3. Metode microautoradiografice de determinare a duratei ciclului mitotic

Metodele se bazează pe faptul că timidina (precursor al dezoxitimidintrifosfatului) marcată cu ^3H poate fi încorporată direct în ADN în faza de sinteză.

Tehnica de lucru după Quastler și Sherman (1959):

— Semințele germinează la temperatură constantă, de exemplu 23°C.

— Se trec apoi în soluție nutritivă Hoegland, la aceeași temperatură, minimum 24 de ore.

— Se efectuează tratamentul cu timidină ^3H, în concentrație de 1—2 μCi/ml, 15 minute — 2 ore, în funcție de specie.

— Prefixarea materialului se face cu o soluție de colchicină 0,05%, timp de 1,5 ore; pentru determinarea indicelui mitotic nu se prefixează materialul.

— Se trece materialul în apă de robinet.

— Fixarea în alcool etilic-acid acetic (3 : 1), a cîte 4—5 rădăcini, din oră în oră, de la finele tratamentului cu colchicină, timp de 25—30 de ore.

— Hidroliză în HCl 1N la 60°C, timp variabil în funcție de specie, și colorare Feulgen.

— Se fac preparate de tip squash, iar autoradiografiile se fac la întuneric, folosindu-se filme sau o emulsie specială.

— Pentru impresionarea filmului sau a emulsiei, materialul se lasă 3—4 săptămîni la întuneric, la 2—4°C.

— Se determină frecvența, în procente, a metafazelor marcate la fiecare interval de timp la care s-a fixat materialul.

Prin această metodă se pot determina atît lungimea totală a ciclului mitotic, cît și durata diferitelor faze. Studiul frecvenței celulelor marcate, la diferite intervale de timp de la marcaj, arată că la început are loc o creștere a acestei frecvențe pînă la un maximum, apoi o descreștere și după un anumit timp o nouă creștere ajungînd la un al doilea maxim. Lungimea totală a ciclului mitotic este dată de intervalul dintre momentul cînd se realizează jumătate din frecvența maximă a primei și a celei de-a doua curbe ascendente. Grant și Heslot (1966) au determinat la *Vicia faba* lungimea totală a ciclului mitotic, la 19°C, de 18 ore.

Interpretarea rezultatelor se face după metoda lui Quastler și Sherman (1959) și metoda Wimber (1960). Pentru a înțelege mai bine modalitatea de interpretare s-au reprezentat într-un grafic date ipotetice pe baza cărora s-a calculat durata unui ciclu mitotic și a fazelor sale (fig. 4).

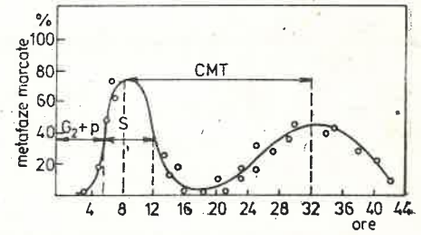


Fig. 4. — Durata totală a ciclului mitotic (CMT) și a fazelor componente, determinată prin metoda microautoradiografiei.

Perioada de timp în care numărul de celule marcate atinge 50% din totalul celulelor marcate reprezintă durata fazei G_2 + *profaza*. Durata fazei G_2 + profaza s-a estimat la 5,5 ore. Durata lui G_2 se obține prin scăderea duratei profazei. În exemplul reprezentat în grafic 0,64 ore reprezintă profaza. Deci $G_2 = 5{,}5 - 0{,}64 = 4{,}86$ ore.

Faza de sinteză S este definită prin lungimea platoului primei curbe minus timpul de marcare și se determină prin măsurarea distanței între cele două niveluri de marcare de pe panta ascendentă și cea descendentă a curbei, unde celulele marcate ating 50% din totalul celulelor. În exemplul luat, faza S poate fi estimată la 6,4 ore.

Durata ciclului mitotic total (CMT) poate, de asemenea, să fie estimată din același grafic deoarece cele două vîrfuri ale curbei reprezintă cele două valuri de celule sincronizate care intră în metafază după marcare. Distanța dintre punctele de mijloc ale vîrfurilor reprezintă lungimea medie a ciclului mitotic total și anume aproximativ 22 de ore.

Durata mitozei se calculează după metoda lui Sparvoli și colab. (1966). După marcare, celulele care au fost în faza S în timpul tratamentului se identifică ușor. Pornind de la faptul că numărul de celule în fiecare stadiu al mitozei la un moment dat este proporțional cu timpul necesar pentru completarea acestui stadiu, se poate aplica formula lui Sparvoli (1966):

$$\frac{n_S}{t_S} = \frac{n_P}{t_P} = \frac{n_M}{t_M} = \frac{n_{AT}}{t_{AT}}$$

în care: n_S = numărul de celule în faza de sinteză;
n_P = numărul de celule în profază;
n_M = numărul de celule în metafază;
n_{AT} = celule în anafază și telofază;
t_S = timpul necesar fazei de sinteză;
t_P = timpul necesar profazei;
t_M = timpul necesar metafazei;
t_{AT} = timpul necesar anafazei și telofazei.

Se numără aproximativ 1 000 de celule marcate în faza de sinteză sau în diviziune la o oră după tratament, și se obține, de exemplu: $n_S = 820$, $n_P = 82$, $n_M = 51$, $n_{AT} = 47$. Avînd în vedere că valoarea lui t_S este cunoscută din curbă (6,4 ore), se obține: $\frac{820}{6,4} = \frac{82}{t_P}$ de unde $t_P = \frac{82 \times 6,4}{820} = 0,64$ ore. În același mod se obțin celelalte necunoscute: $\frac{820}{6,4} = \frac{51}{t_M}$, de unde $t_M = \frac{51 \times 6,4}{820} = 0,40$ ore; $\frac{820}{6,4} = \frac{47}{t_{AT}}$, de unde $t_{AT} = \frac{47 \times 6,4}{820} = 0,37$ ore.

În total mitoza durează 1,4 ore.

Pentru calculul duratei fazei G_1 se scade din durata ciclului mitotic total mitoza + G_2 + S, obținîndu-se o durată medie de 9,34 ore.

Cercetările lui Van't Hof (1965) privind ciclul mitotic la 6 specii de plante au demonstrat că acesta este variabil ca durată, fapt datorat, în primul rînd, cantității diferite de ADN per nucleu. La *Crepis capilaris*, *Impatiens balsamina* și *Lycopersicon aesculentum*, la care cantitatea de ADN este relativ redusă, ciclul mitotic este mai scurt, în timp ce la *Allium cepa*, *A. fistulosum* și *Tradescantia paludosa*, la care nucleii sînt mai mari și conțin mai mult ADN, ciclul mitotic este mai lung. Pe baza acestor cercetări s-a conchis că durata ciclului mitotic reflectă durata fazei S

în care se sintetizează ADN. Corelația directă dintre lungimea fazei S, respectiv a ciclului mitotic, și cantitatea de ADN per celulă ce trebuie sintetizată se realizează datorită ratei relativ constante a replicării ADN.

Tehnica de lucru după Țițu (1966):

Autorul a efectuat determinări la secară, tomate și sfecla de zahăr.

— Rădăcinile (10 mm) nedetașate de semințe se cufundă într-o soluție de timidină ^3H în concentrație de 2 μCi/ml, în care se țin 24 de ore.

— După ce se fixează rădăcinile (din 2 în 2 ore pe parcursul celor 24 de ore), se efectuează preparate prin metoda secționării și includerii în parafină (vezi cap. 2).

— Secțiunile pregătite după metoda obișnuită, înainte de colorare, se tratează cu ribonuclează 2%, timp de 3 ore, așezîndu-se în cutii Petri, pe hîrtie de filtru umedă. Peste secțiuni se pun cîteva picături de ribonuclează; se introduc la 38°C și se are grijă permanent ca deasupra secțiunilor să fie un strat de ribonuclează, prin adăugare de picături.

— Preparatele se spală cu apă de robinet, 12 ore, apoi în două băi de apă distilată, cîte 5 minute.

— Se deshidratează în două băi de alcool 96°, cîte 5 minute, și se usucă la aer.

— Pe preparate se depune un substrat conținînd gelatină (0,385 g), alaun de crom 3% (2,5 ml) și apă distilată (90 ml), peste care se pune emulsia (EN_2, IFA); expunerea durează 20 de zile la 4°C.

— Autoradiografiile se developează și se fixează.

— Preparatele se colorează și se observă la microscop în scopul depistării nucleilor în care a avut loc sinteza ADN și deci s-a încorporat timidina. Nucleii se consideră marcați dacă deasupra lor se află cel puțin 3 granule.

Pentru interpretarea determinării duratei ciclului mitotic și a fazelor sale se folosesc metoda Quastler și Sherman (1959) și metoda Wimber (1960) (vezi fig. 4).

1.1.4. Determinarea lungimii ciclului mitotic prin inhibarea formării plăcii ecuatoriale (după Kihlman și Levan, 1949)

O seamă de agenți chimici, mai ales cei din grupul oxipurinelor metilate cum sînt: cafeina, teobromina, teofilina etc., au capacitatea de a bloca formarea plăcii ecuatoriale în cursul diviziunii celulare, fără a afecta însă sinteza ADN și replicația cromozomilor, respectiv a nucleilor. Prin utilizarea acestor agenți, în cursul unei singure diviziuni se formează celule binucleate, iar dacă acțiunea continuă mai multe diviziuni se formează celule multinucleate.

Se procedează astfel:

— Se efectuează un tratament continuu al rădăcinilor (0,5—1 cm) cu unul din agenții inhibitori amintiți, în concentrație de 0,02—0,04%;

— Se fixează cu alcool etilic — acid acetic glacial (3 : 1), cîte 4—5 rădăcini, din oră în oră, timp de 25—30 de ore;

— Pe preparate squash, colorate Feulgen, se determină frecvența celulelor bi- și multinucleate.

Intervalul de timp de la începutul tratamentului pînă la primul maxim de celule binucleate constituie durata ciclului mitotic. Celulele binucleate apar după 30 minute de la începutul tratamentului, iar în cazul în care inhibitorul este eliminat, după 30 minute se formează din nou placa ecuatorială. Trebuie menționat că, uneori, cei 2 nuclei-fii fuzionează, dînd naștere unui nucleu tetraploid, datorită faptului că fusurile nucleare, respectiv cromozomii rămîn alăturați.

Această metodă poate fi utilizată pentru marcarea unei populații de celule, care poate fi apoi urmărită în cursul uneia sau cîtorva cicluri mitotice, întocmai ca prin marcarea cu colchicină.

1.2. Sincronizarea diviziunii celulare și determinarea duratei ciclului mitotic în culturi de celule vegetale

Sincronizarea parțială sau completă a diviziunii celulare în culturi de celule vegetale este necesară în scopul efectuării de cercetări de metabolism celular, mutageneză chimică și fizică, precum și pentru determinarea lungimii ciclului mitotic total. Agenții sincronizatori sînt, în general, substanțe chimice, cu efect inhibitor asupra ADN sau diviziunii celulare, folosiți atît la plante și animale, cît și în culturi de celule *in vitro*.

1.2.1. Sincronizarea parțială a diviziunii celulare în culturi celulare în suspensie (după Eriksson, 1966)

S-a studiat efectul mai multor substanțe sincronizatoare (5-aminouracil, hidroxiuree, 5-fluordezoxiuridină, excesul de timidină) în culturi celulare de *Haplopappus gracilis*. Liniile celulare trebuie să se caracterizeze printr-o creștere rapidă și o bună separare celulară.

— Tratamentul cu agenți sincronizatori se aplică la culturi în vîrstă de o zi, obținute din linii subcultivate regulat, la fiecare două zile (în experiențele cu timidină, culturile sînt în vîrstă de 3 zile) și durează 12 sau 14 ore, în funcție de agentul folosit (tabelul nr. 2). Substanța se dizolvă în mediul de cultură.

— După tratament, celulele sînt spălate de două ori în mediu nutritiv proaspăt și apoi transferate în vase cu mediu proaspăt.

— Se iau probe pentru fixare la diferite intervale de timp de la tratament. Nu se face prefixare deoarece s-a constatat că la temperatura optimă de cultură (30°C) colchicina produce o vîscozitate foarte accentuată care împiedică analiza și numărarea cromozomilor.

— Colorarea se realizează cu orceină lactopropionică, care se prepară astfel: 1 g orceină se dizolvă în 100 ml dintr-un amestec în părți egale

Tabelul nr. 2

Diverse tratamente folosite pentru obținerea de populații sincrone de celule

Agentul chimic sincronizator	Tratament		Timp între tratament și fixare (ore)	Indice mitotic
	ore	concentrații		
Martor	0	0	0	se calculează la fiecare probă după formula indicată la indicele mitotic
5-aminouracil	24	4 mM	2, 6, 10, 12, 14,	
		10 mM	16, 18, 20, 22,	
		10 mM	24, 26, 30, 34, 40	
Hidroxiuree	24	1 mM	„	
		3 mM	„	
5-fluordezoxiuridină	12	2.10^{-7}M	„	
		2 mM	„	
Timidină în exces	24	4 mM	„	
		6 mM	„	

din acizii propionic și lactic. Această soluție se prepară la temperatura camerei și se folosește după filtrare, fără diluare.

— Pe o lamă curată se pun cîteva picături din suspensia celulară și se absoarbe mediul cu o hîrtie de filtru.

— Se adaugă cîteva picături din colorant, apoi preparatul se încălzește ușor la 60°C, timp de 2 minute. Se aplică lamela și se presează cu grijă fără a se deplasa. Astfel pot fi obținute preparate cromozomice de bună calitate din material proaspăt.

În funcție de material, dacă această metodă nu dă rezultate, poate fi folosită o altă metodă:

— După o scurtă fixare în fixatorul Carnoy, se îndepărtează fixatorul prin centrifugare.

— Se face o hidroliză în HCl 1N, la 60°C, 5 minute.

— Celulele sînt din nou centrifugate, este îndepărtată soluția de HCl și se colorează cu orceină lactopropionică. Cu ambele tehnici se pot face preparate permanente.

Indicele mitotic. Pentru determinarea indicelui mitotic, se numără minimum 800 de celule pentru fiecare probă. Trebuie știut că numărul total de celule analizate include atît interfazele, cît și celulele în mitoză. Formula după care se calculează indicele mitotic este următoarea:

$$IM = \frac{\text{număr de celule în mitoză}}{\text{număr total de celule analizate}} \cdot 100$$

Se consideră că agentul sincronizator folosit este eficace atunci cînd produce un indice mitotic cel puțin dublu decît cel constatat la proba martor.

În cazul în care se folosește ca agent sincronizator 5-fluordezoxiuridina, cunoscut ca agent inhibitor al sintezei ADN, mai precis al sintezei acidului timidilic, celulele sînt transferate după tratament pentru 24 de ore în mediu proaspăt suplimentat cu timidină ($4 \cdot 10^{-5}$M) (timidina are rolul de a contracara efectul inhibitor al FUdR); în acest timp se fac fixările pentru determinarea indicelui mitotic.

Studiile citologice au demonstrat că atît 5-aminouracilul, cît şi 5-fluordezoxiuridina, dar mai ales hidroxiureea produc fragmentări cromozomiale şi leziuni acromatice. Din acest motiv, sincronizarea diviziunii celulare cu aceste substanţe se foloseşte mai mult în studii biochimice şi fiziologice şi mai puţin în studii citologice.

1.2.2. Durata ciclului mitotic în culturi de celule vegetale

Durata ciclului mitotic poate fi obţinută uşor prin numărarea celulelor. Intervalul de timp în care o populaţie celulară îşi dublează numărul de celule este considerat egal cu durata unei generaţii. Prin această metodă nu poate fi însă determinată lungimea fiecărei faze ce compune ciclul mitotic.

În acest scop se foloseşte **tehnica marcării cu timidină tritiată** urmată de **autoradiografie,** ca şi în cazul meristemelor radiculare:

— Cultura în vîrstă de o zi, din linii subcultivate regulat la fiecare două zile, este tratată cu timidină tritiată timp de 30 minute; timidina tritiată se dizolvă în mediul de cultură, în concentraţie de 1 μCi.

— După tratament, celulele sînt spălate de trei ori în mediu proaspăt, la temperatura de cultură, pe un filtru de mătase, şi reincubate pe mediu nutritiv proaspăt. În timpul şi după tratament celulele sînt continuu aerate.

— Probele sînt recoltate la fiecare jumătate de oră în primele 3 ore, din oră în oră între a treia şi a noua oră după tratament, şi apoi din două în două ore.

— Celulele se fixează în alcool etilic : acid acetic glacial (3 : 1) pentru 24—40 de ore.

— După fixare, celulele sînt spălate în apă distilată şi hidrolizate pentru 6 minute în 1N HCl, la 60°C.

— Se colorează cu fucsină leucobazică, timp de 45 minute.

Între aceste proceduri, celulele sînt centrifugate şi supernatantul eliminat.

— Preparatele squash se fac în acid acetic 45%. Lamelele se desprind prin tehnica gheţii uscate, iar lamele sînt trecute printr-un set de băi de la alcool etilic absolut la apă distilată.

— Autoradiografierea se face cu ajutorul filmului sau emulsiei speciale, timp de 7 zile, la frigider la 4°C.

— După developare (8 minute), lamele se clătesc în apă distilată, un minut, apoi se trec în fixator special, 6 minute, se spală în apă de robinet, 1/2—1 oră, şi se usucă la aer.

Interpretarea rezultatelor şi calculul duratei ciclului mitotic şi al fazelor componente se efectuează după metoda Quastler şi Sherman (1959) şi metoda Wimber (1960) exemplificate în fig. 4.

Este foarte important de subliniat că în astfel de studii condiţiile de cultură trebuie să se menţină constante, vîrsta celulelor, temperatura, lumina, mediul de cultură influenţînd durata ciclului mitotic. Valorile obţinute se referă strict la condiţiile de mediu existente în timpul experimentului respectiv.

1.3. Determinarea duratei meiozei la plantele superioare

1.3.1. Durata meiozei în celulele-mamă polinice

Durata meiozei la plantele superioare este mai puţin studiată decît durata stadiilor ciclului celular somatic. Motivul constă în dificultatea recoltării probelor la intervale de timp corespunzător stadiilor diviziunii sau a introducerii unui precursor marcat al ADN, care să permită urmărirea încorporării sale de-a lungul fazelor meiozei. Deoarece observarea directă a meiozei *in vivo* este greu de realizat, la organismele multicelulare s-au găsit metode indirecte:

— metode ce se bazează pe prelevarea de probe la intervale diferite de timp (metoda probelor), care se aplică la speciile care au o dezvoltare sincronă atît între anterele unei inflorescenţe, cît şi de-a lungul aceleiaşi antere.

— metode ce se bazează pe marcarea cu izotopi radioactivi.

Pentru ambele categorii de metode plantele trebuie crescute în seră, în condiţii de mediu cît mai constante. Metodele se aplică în funcţie de gradul de dezvoltare sincronă a anterelor, de mărimea lor, deci de posibilitatea de manipulare şi de durata aproximativă a meiozei la planta respectivă.

Metoda de prelevare a probelor (după Bennett, Chapman şi Riley, 1971) constă în măsurarea timpului necesar celulelor-mamă polinice (PMC — „Pollen mother cells"), aflate într-un anumit stadiu cunoscut al meiozei, pentru a parcurge stadiul următor. În acest mod se poate măsura durata totală a meiozei şi a stadiilor componente.

Material şi condiţii de lucru. Autorii au măsurat durata meiozei la secară (*Secale cereale*) $2n = 14$, grîu (*Triticum aestivum*) $2n = 42$ şi *Triticale*, $2n = 56$.

Plantele se cresc în seră în condiţii de lumină continuă şi temperatură constantă (20°C), condiţii care se păstrează în tot timpul experimentului. Exact înainte de înspicare se selecţionează fraţii pentru determinarea duratei meiozei. Toate determinările se fac în seră, numai determinările pe perioade scurte, de 6 ore sau mai puţin, se pot face în laborator, dar păstrîndu-se aceleaşi condiţii ca şi în seră. Deoarece secara are numai două flori fertile per spiculeţ, iar grîul şi triticalele 4 flori fertile per spiculeţ, la cele trei specii s-a lucrat numai pe cîte 2 flori per spiculeţ, alegîndu-se cele mai dezvoltate. La cereale, în general, meioza se analizează folosindu-se spiculeţele cele mai avansate în dezvoltare, care se găsesc întotdeauna în regiunea de mijloc a spicului (acropetal şi bazipetal apar spiculeţe mai puţin avansate). De fapt, condiţiile pe care se bazează această metodă sînt, pe de o parte, o anumită fază de dezvoltare în spiculeţele succesive din cadrul spicului şi, pe de altă parte, dezvoltarea aproximativ sincronă a celulelor-mamă polinice în cele trei antere ale unei flori.

În timpul analizei, spicul rămîne ataşat de plantă, iar anterele studiate rămîn ataşate la receptacul.

În funcție de mărimea anterelor, în cadrul metodei de prelevare a probelor se folosesc două procedee (I și II).

P r o c e d e u l I se folosește la plante cu antere mai mari, deoarece implică excizia segmentelor apicale ale acestora, și o sincronizare aproape perfectă a dezvoltării celulelor-mamă polinice de-a lungul aceleiași antere și între cele 3 antere ale unei flori.

Se excizează cu grijă, cu o foarfecă bine ascuțită, segmentele apicale ale celor 3 antere din două flori ale fiecărui spiculeț (fig. 5). Aceste segmente se fixează în alcool etilic: acid acetic (3 : 1), în fiole separate, și se notează ora la care s-a făcut excizia. Acesta este *momentul de prelevare a probei*. Apoi spicul se acoperă cu o pungă de plastic, conținînd cîteva picături de apă, pentru a împiedica uscarea anterelor secționate. După anumite intervale de timp de la momentul de prelevare (de la 4 la 24 de ore), se iau spice întregi și se fixează în alcool etilic : acid acetic (3 : 1), iar porțiunile distale ale anterelor din fiecare floare de la care s-au prelevat probele inițiale se analizează microscopic, separat, și se notează stadiul meiotic găsit. Acest moment se numește *momentul de fixare*.

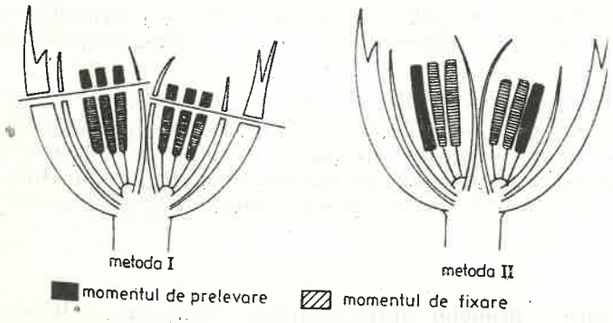


Fig. 5. — Excizia anterelor în momentul prelevării și momentul de fixare.

Comparîndu-se stadiul meiozei găsit în momentul de prelevare cu stadiul meiozei găsit în momentul de fixare se stabilește progresul în desfășurarea meiozei, iar intervalul de timp dintre aceste două momente reprezintă durata stadiului meiotic constatat în antere la momentul de fixare.

Preparatele microscopice se fac prin metoda Feulgen, pentru ca stadiile meiotice să se distingă mai ușor. Se analizează circa 700 de antere per specie.

Procedeul a mai fost aplicat la *Fulbaghia violacea* (Taylor, 1953) și *Tradescantia paludosa* (Steinitz, 1944).

P r o c e d e u l II se folosește la plante cu antere mai mici. Îndepărtarea și fixarea în alcool-acetic a cîte unei antere întregi de la fiecare din cele două flori dintr-un spiculeț reprezintă *momentul de prelevare a probei*, operație care se face cu grijă pentru a nu produce leziuni fizice pe celelalte antere. Spicul se păstrează ferit de uscăciune, ca și în procedeul I. De asemenea, numărul de antere luate în studiu este același. La intervale

de fixare cunoscute (momentul de fixare), celelalte două antere rămase în fiecare floare sînt disecate și examinate. Ca și în procedeul I, durata totală a meiozei sau durata stadiilor componente se determină pe preparate Feulgen prin măsurarea timpului dintre momentul prelevării probei și diferitele intervale de fixare.

Procedeul a mai fost aplicat la *Antirrhinum majus* (Ernst, 1938) și *Endymion nonscriptus* (Wilson, 1959).

Interpretarea rezultatelor. Momentul declanșării meiozei se consideră începerea leptotenului, cînd se evidențiază prima dată continuitatea lineară a întregului complement cromozomial.

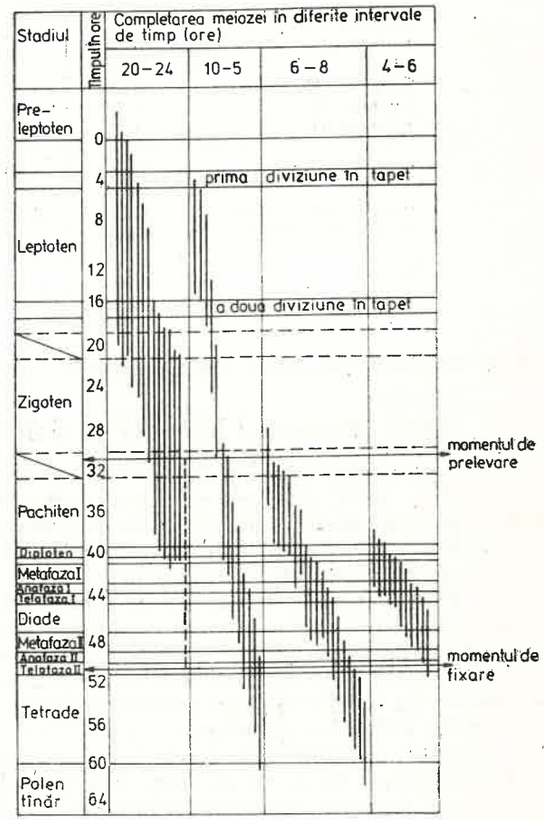


Fig. 6. — Durata meiozei în PMC la *Secale cereale* (după Bennett, 1971). Fiecare linie verticală reprezintă timpul în ore și dă durata stadiului sau, mai exact, a cîtorva stadii ce s-au completat în intervalul respectiv de timp. De exemplu, linia întreruptă, din coloana 20—24, reprezintă un grup de antere prelevate la un moment dat și fixate după 20—24 de ore, care și-au completat meioza de la pachitenul timpuriu la telofaza II în aproximativ două ore.

Este evident faptul că, în cazul ambelor procedee, fixările la intervale lungi de timp între momentul prelevării probei și momentul de fixare folosesc pentru măsurarea duratei totale a meiozei, iar cele la intervale scurte folosesc pentru măsurarea fiecărui stadiu al meiozei. Este posibilă astfel o confirmare a rezultatelor, prin compararea duratei totale a meiozei cu suma duratelor stadiilor individuale (fig. 6, tabelul nr. 3).

Tabelul nr. 3

Durata (în ore) a meiozei, a stadiilor componente și a stadiului de tetradă (după Bennett, Chapman și Riley, 1971)

Stadiul	*Secale cereale*	*Triticum aestivum*	*Triticale*
Leptoten	20,0	10,4	7,5
Zigoten	11,4	3,4	3,0
Pachiten	8,0	2,2	2,2
Diploten	1,0	0,6	1,0
Diachineză	0,6	0,4	0,5
Metafaza I	2,0	1,6	1,8
Anafaza I	1,0	0,5	0,5
Telofaza I	1,0	0,5	0,5
Diada	2,5	2,0	1,5
Metafaza II	1,7	1,4	1,2
Anafaza II	1,0	0,5	0,5
Telofaza II	1,0	0,5	0,5
Durata meiozei	51,2	24,2	20,7
Durata primei profaze	41,0	16,0	14,2
Durata M I—M II	10,2	8	6,5
Tetrade	8,5	10,0	7,3

1.3.2. Durata meiozei determinată prin marcare cu timidină tritiată (după Bennett, Chapman și Riley, 1971)

Cu această metodă se poate determina intervalul de timp dintre sinteza principală de ADN, care precede meioza (faza S premeiotică), și diferitele stadii meiotice. Autorii au aplicat această tehnică la grîu.

— De la plante crescute în seră se recoltează fraţi ale căror inflorescenţe au flori exact în stadiul de a intra în meioză.

— Fraţii, tăiaţi la baza celei de-a treia frunză, sînt introduşi imediat în apă. Apoi sînt imersionaţi cu capetele tăiate într-o soluţie apoasă de timidină tritiată, preparată proaspăt (50 μCi/ml), timp de 1,5—2,5 ore.

— Capetele imersionate sînt spălate și imersionate din nou în apă de robinet. În timpul și după tratament fraţii sînt menţinuţi la temperatură (20°C) și lumină constante.

— După tratament, anterele sînt fixate în alcool etilic : acid acetic (3 : 1), la diferite intervale de timp. Din fiecare frate, anterele sînt fixate în pachiten/diploten, metafaza I/anafaza I, metafaza II/anafaza II sau tetrade.

— Din anterele colorate Feulgen se fac preparate squash pe care se aplică emulsia sau filmul special pentru autoradiografie.

— Lamele astfel pregătite sînt uscate la aer și păstrate la 4°C, la întuneric, timp de 100 de zile.

— Apoi sînt developate, fixate, spălate cu apă și examinate microscopic pentru prezenţa specifică de izotopi în celulele meiotice.

Durata meiozei a fost determinată la mai multe specii de plante (tabelul nr. 4), dintre care la unele autoradiografic.

Tabelul nr. 4

Durata meiozei la 16 specii de plante (după Bennett, 1971)

Specia	Durata meiozei (în ore)	Numărul de cromozomi	Gradul de ploidie
Triticale	20,75	56	8 *x*
Antirrhinum majus	20,4	16	2 *x*
Triticum aestivum	24,0	42	6 *x*
Haplopappus gracilis	36,0	4	2 *x*
Rhoeo discolor	48,0	12	2 *x*
Secale cereale	51,2	14	2 *x*
Allium cepa	96,0	16	2 *x*
Ornithogalum virens	72,0	6	2 *x*
Tradescantia paludosa	126,0	12	2 *x*
Tulbaghia violacea	130,0	12	2 *x*
Tradescantia reflexa	144,0	24	4 *x*
Lilium candidum	168,0	24	2 *x*
Lilium henryi	170,0	24	2 *x*
Lilium longiflorum	192,0	24	2 *x*
Trillium erectum	274,0	10	2 *x*
Agapanthus umbellatus	300,0	30	2 *x*

Din punctul de vedere al tehnicii cromozomii meiotici la plante sînt mai dificil de marcat decît cei de la animale. La plante, introducerea izotopului marcat și timpul de tratament variază în funcţie de durata aproximativă a meiozei. De exemplu, la *Lilium longiflorum*, unde microgametogeneza durează mai mult de o săptămînă, expunerea celulelor la timidină tritiată durează 20—28 de ore (Taylor și McMaster, 1954), iar la grîu, la care meioza durează 24 de ore (Bennett, 1971), este suficientă o expunere de o oră. De asemenea, concentraţia de timidină marcată folosită la plante are o variaţie mai mare decît la animale, de la 20 μCi/ml (*Ornithogalum virens*) pînă la 500 μCi/ml (*Agapanthus umbellatus*). Tot de durata totală a meiozei depinde și procedeul de introducere a soluţiei de marcare în inflorescenţă. Metoda lui Bennett (1971), de îndepărtare a inflorescenţei prin tăiere și introducere în soluţia marcată, poate fi folosită numai la plante la care meioza este relativ scurtă (1—3 zile), deoarece inflorescenţele tăiate, ţinute mai multe zile în soluţie sau apă, pot muri înainte de a completa meioza. La plantele la care meioza durează mai multe zile se folosesc tehnici de introducere directă a soluţiei marcate printr-un fitil tras prin peduncul direct sub mugurele floral, cel mai de jos, celălalt capăt al fitilului fiind introdus în soluţia marcată (Gear și Spencer, 1963). Lima-de-Faria (1965) studiază meioza la *Agapanthus umbellatus*, făcînd din bractee o cupă ce conţine soluţia marcată, menţinînd-o în jurul anterelor.

Trebuie subliniat că între rezultatele obţinute prin metoda probelor și metoda de marcare există corelaţie dacă se respectă cu strictеţe condiţiile constante de temperatură și lumină.

1.3.3. Durata meiozei în celulele-mamă ale sacului embrionar (după Bennett, Finch Smith și Rao, 1973)

Pînă în anul 1973, în literatură nu a fost citată nici o lucrare care să se ocupe de durata meiozei femele la plantele superioare. Cauza lipsei unor astfel de studii este de ordin tehnic, asociată cu localizarea și manipularea dificilă a celulelor-mamă ale sacului embrionar (EMC=Embrion mother cells). Cele mai multe plante produc sute sau mii de celule-mamă polinice, pentru fiecare celulă-mamă a sacului embrionar. Existența unei singure celule-mamă embrionare per floare, la cereale de exemplu, face imposibilă aplicarea metodelor de prelevare a probelor sau de marcare cu izotopi radioactivi.

Metoda de determinare a duratei meiozei femele la cereale, descrisă de autori, constă în compararea directă a stadiului de dezvoltare meiotică în celula-mamă embrionară cu stadiul de dezvoltare meiotică în celulele-mamă polinice din aceeași floare. Această metodă s-a aplicat la grîu, secară și orz, deoarece autorii au demonstrat dezvoltarea sincronă atît de-a lungul unei antere, cît și între cele 3 antere ale unei flori.

Meioza femelă se desfășoară adesea în cadrul florilor individuale în același timp cu meioza masculă.

Tehnica de lucru :

— Inflorescențele se fixează în alcool : acid acetic (3 : 1) sau în Carnoy.

— După fixare, din fiecare floare sînt disecate anterele și ovarele, hidrolizate 10 minute în 1N HCl, la 60°C, și colorate Feulgen.

— Apoi ovulul se scoate pe o lamă, la o lupă binoculară, într-o picătură de acid acetic 45%, după care se acoperă cu o lamelă și se apasă ușor pentru etalarea celulelor nucelei.

— După ce se determină stadiul meiotic în care se găsesc aceste celule, se disecă antерele din aceeași floare, se fac preparate squash și se compară stadiul meiotic din antere cu cel din ovul.

— Se examinează 30—60 de celule-mamă embrionare per specie și se compară dacă dezvoltarea este sincronă sau nu. Dacă cele două meioze nu sînt sincrone atunci diferența de stadiu de dezvoltare între ele poate fi exprimată în ore, luînd ca standard durata stadiilor meiozei mascule, în aceleași condiții de mediu (fig. 7).

În practică, variația naturală și erorile de prelevare a probelor duc la o împrăștiere a punctelor în jurul liniilor ipotetice, dar linia urmărită poate fi calculată cu ajutorul analizei regresiei liniare. Linia de regresie se folosește pentru evidențierea corelației dintre două caractere variabile și anume legăturile lor de dependență, în cazul nostru, sincronizarea sau asincronizarea desfășurării meiozei celor două sexe. Se folosește formula : $y = a + bx$, în care y = axa pe care se reprezintă meioza masculă, a = punctul de intersecție al axei y de către dreapta de regresie, b = înclinația dreptei de regresie și x = axa pe care se reprezintă meioza femelă. În cazul unei sincronizări perfecte a = 0 și b = 1.

Există 3 posibilități de comparație :

a. Dacă meioza este sincronă în meiocitele mascule și femele în fiecare din florile analizate, atunci toate punctele din grafic ar trebui să se înscrie pe o linie care trece exact prin punctul de origine 0 și să aibă o înclinație egală cu unitatea (b = 1, 0).

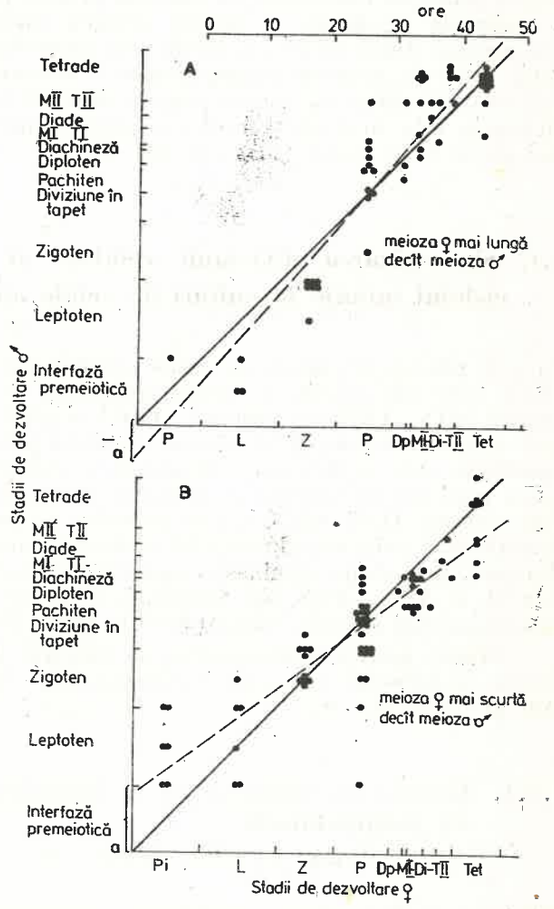


Fig. 7. — Durata meiozei în EMC la *Hordeum vulgare* comparativ cu durata meiozei în PMC la aceeași specie (după Bennett, 1973). Linia de regresie așteptată în cazul unei sincronii complete este reprezentată de o dreaptă continuă, iar linia de regresie obținută este reprezentată de o dreaptă întreruptă.

b. Dacă meioza în fiecare floare înaintează cu aceeași rată în celulele-mamă ale sacului embrionar și celulele-mamă polinice, dar începe mai devreme cu o perioadă constantă de timp în cazul unui sex, atunci toate punctele trebuie să se găsească pe o linie sau în jurul ei avînd o înclinație tot egală cu unitatea, dar care taie o axă la o distanță egală cu diferența de timp constantă.

c. Dacă meioza în mod normal are loc cu rate diferite în meiocitele celor două sexe, atunci punctele pentru flori individuale trebuie să cadă pe o linie cu o altă înclinație decît unitatea, indicînd duratele relative ale celor două tipuri de diviziuni meiotice.

Presupunînd că durata meiozei mascule este cunoscută, atunci durata meiozei femele poate fi calculată cu ajutorul înclinației liniei de regresie pentru punctele observate. În cazurile în care punctele cad pe o linie cu o înclinație egală cu 1 atunci durata meiozei mascule și femele este aceeași. Dacă meioza masculă este reprezentată pe ordonată și înclinația liniei de regresie pentru punctele observate este mai mare decît unitatea înseamnă că meioza femelă durează mai mult (fig. 7A); dacă înclinația este mai mică decît unitatea, atunci meioza femelă durează mai puțin decît meioza masculă (fig. 7B).

1.4. Sincronizarea diviziunii celulare și determinarea duratei ciclului mitotic în culturi de celule animale

Ca și la plante, în culturi de celule animale pot fi obținute populații sincrone, care sînt folosite în studii referitoare la mutageneză, perioada de sinteză ADN, ARN sau proteică. Astfel, studiul efectului diferiților mutageni asupra celulelor în diviziune sincronă permite depistarea stadiului specific în care acționează mutagenul, a aberațiilor cromozomiale induse sau a modului de acțiune a agentului mutagen studiat. Studiile privind rata sintezei ADN, ARN sau de proteine pe populații sincrone de celule se realizează prin introducerea în mediul ce conține celule cu o diviziune sincronă, deci după eliminarea agentului sincronizator, a unui precursor marcat al ADN, ARN sau proteinei, respectiv timidină ^3H, uridină ^3H sau aminoacizi marcați (Regan și Chu, 1966; Bollum, 1959).

Dintre agenții sincronizatori, în culturile de celule animale, ca și la plante, se folosește mai mult 5-aminouracilul, inhibitor al diviziunii celulare în fazele G_1—S.

1.4.1. Metoda de sincronizare a diviziunii celulare cu 5-aminouracil (după Regan și Chu, 1966)

Această metodă poate fi aplicată atît în suspensii celulare, cît și în cultură monostrat de celule de la mamifere și om.

— Celulele sînt tratate timp de 24 de ore cu o concentrație finală de 3×10^{-3} M 5-aminouracil, dizolvat în mediul de cultură.

— După 24 de ore, atît proba de celule tratate, cît și proba control sînt centrifugate și resuspendate într-un mediu proaspăt, la 37°C și pH 7,2—7,4. Timpul în care agentul este îndepărtat din mediu se numește *timpul 0*.

1.4.2. Metodă pentru determinarea lungimii ciclului mitotic prin marcare cu timidină tritiată

Studiul ciclului mitotic la celulele animale și umane se realizează prin metoda microautoradiografiei. Marcarea se efectuează cu timidină tritiată, folosindu-se în acest scop metoda marcării continue și metoda marcării intermitente.

În cazul marcării continue, în mediul de cultură se introduce timidină tritiată, care rămîne acolo pînă la recoltarea celulelor în vederea studiului; concentrația folosită este mai redusă, 1 μCi/ml. Prin marcarea intermitentă se preconizează introducerea timidinei tritiate în mediul de cultură pentru o perioadă relativ redusă de timp (10—15 minute), după care se elimină prin centrifugare, celulele fiind transferate pe un mediu nemarcat; în acest caz concentrația folosită este mai mare (5 μCi/ml). Toate operațiile de microautoradiografie se fac la întuneric sau lumină roșie filtrată.

Pentru studiul autoradiografic se folosesc emulsii nucleare sub formă de gel sau film pe plăci de sticlă. După Nachtigal și colab. (1968), tehnica de acoperire a preparatelor cromozomiale cu emulsie fabricată la noi în țară EN_2IFA este următoarea:

— Emulsia sub formă de gel se topește la 37°C într-un termostat. La 1 ml emulsie topită se adaugă 0,5 ml din următorul amestec final:

Timol 3% în alcool	50 ml
Glicerină	25 ml
Acetat de crom 3%	25 ml

Emulsia astfel obținută se diluează cu apă distilată (1 volum emulsie la 1,5 volume apă).

— Preparatele cromozomice se imersionează în emulsia diluată, sau emulsia se pune pe lamă cu ajutorul unei pipete într-un strat de 5—7μ. După aceea, lamele se usucă la 22 ± 2°C, se introduc într-o cutie bine închisă pentru a nu pătrunde lumina și se adaugă silicagel sau clorură de calciu pentru a se asigura un mediu deshidratat.

— Cutia cu lame se păstrează la frigider, la 4°C, timp de 7 zile.

— Lamele se developează în următorul revelator:

Sulfit de sodiu anhidru	12 g
Amidol (clorhidrat de 2,4-diaminofenol)	3 g
Acid citric	1 g
Bromură de potasiu	0,5 g
Apă distilată	1 000 ml

Developarea se efectuează la 22°C și durează 1—5 minute, după care lamele se fixează în următorul fixator:

Tiosulfat de sodiu	250 g
Sulfit de sodiu anhidru	2 g
Metabisulfit de potasiu 3%	10 ml
Apă distilată	1 000 ml

— Lamele sînt apoi spălate în apă rece distilată (3—5°C) și se usucă. Ele se pot păstra ca atare sau se pot colora și monta.

— Colorarea se poate face cu soluția Giemsa sau cu soluție de albastru de toluidină, iar montarea în euparal, balsam de Canada sau eukitt.

Schmidt (1963) într-o tehnică similară celei descrise recomandă folosirea benzii de film, adică a emulsiei nucleare montată sub formă de film pe plăci de sticlă (Kodak A.R. 10). Filmul se taie cu bisturiul în camera obscură la lumină roșie, în pătrate de aproximativ 4 cm/4 cm. Placa este introdusă în alcool 75%, timp de 3 minute, și apoi trecută în alcool absolut. Pătratele tăiate la dimensiunile dorite sînt deslipite de pe placă cu ajutorul a două pensete, după care se plasează cu emulsia în jos într-un vas cu apă distilată la temperatura camerei, întinzîndu-se filmul la suprafața apei.

— Se ia o lamă cu preparate microscopice, se introduce în vasul cu apă și, cu grijă, se plasează preparatul sub bucata de film. Prin scoaterea lamei din apă, filmul se lipește la suprafața lamei, acoperind preparatul.

— După uscare, care durează aproximativ 3 ore la temperatura camerei, lamele, cu preparate și film, se introduc într-o cutie bine închisă la întuneric într-un frigider. Operațiunile continuă la fel ca în cazul metodei cu emulsie nucleară sub formă de gel.

Pentru calculul duratei ciclului mitotic și a fazelor sale se aplică aceeași metodă (Quastler și Sherman, 1959; Wimber, 1960). Cercetările noastre (Raicu, Popescu, Cioloca, Nicolaescu și Kirillova, 1972) efectuate la hamsterul românesc prin tehnica de marcare cu timidină tritiată au dus la concluzia că ciclul mitotic are o lungime de 10—11 ore, iar replicarea complementului cromozomial se realizează asincron la nivel intra- și intercromozomial.

1.5. Determinarea duratei meiozei la mamifere

La mascul. Cuplarea metodelor de preparare a cromozomilor prin uscare la aer (Evans și colab., 1964; Meredith, 1969) cu autoradiografia a permis investigarea diferitelor aspecte ale dezvoltării celulelor germinative și ale meiozei. Cu ajutorul metodei de marcare cu izotopi radioactivi pot fi obținute informații despre rata sintezei ADN și ARN, durata diferitelor faze ale meiozei, modele de marcare a cromozomilor sexului și autozomilor în diachineză și metafaza II, tipul de asociere dintre cromozomii X și Y.

Deoarece principiul metodei autoradiografiei este același, și anume de urmărire a celulelor marcate în faza de sinteză premeiotică (S) cu izotopi radioactivi pe tot parcursul diviziunii și determinarea intervalului de timp necesar pentru ca aceste celule să ajungă în fiecare din fazele următoare ale meiozei, vom reda numai aspectele caracteristice ale acestei metode la șoarece după Kofman-Alfaro și Ann Chandley (1970) și la hamsterul chinezesc după Utakoji (1966).

Pentru determinarea duratei meiozei la șoarecele mascul animalele trebuie să fie în vîrstă de aproximativ două luni, cu greutatea de cca 30 g în momentul injecției. Fiecare animal este injectat o singură dată, intraperitoneal, cu timidină ^3H în concentrație de 150 μCi/0,25 ml apă distilată și sacrificat prin dislocare cervicală la intervale diferite de timp (tabelul nr. 5).

Tabelul nr. 5

Marcarea *in vivo* a cromozomilor meiotici la șoarece

Intervalul dintre injecția de marcare și sacrificare	Succesiunea fazelor meiozei
1 ore	—
6 „	—
12 „	—
24 „	zigoten
48 „	—
72 „	pachiten timpuriu
6 zile	—
10 „	pachiten tîrziu
10 „ și 6 ore	diachineză
10 „ și 18 „	diachineză
23 „	primii spermatozoizi

— Preparatele cromozomice se fac prin metoda Evans și colab. (1964) sau Meredith (1969). Lamele se colorează cu carbofucsină preparată după următoarea formulă (Darlington și La Cour, 1976):

A. *Soluție stoc*

Fucsină bazică 3% în alcool 70°	10 ml
Fenol 5% în apă distilată	90 ml

B. *Soluția de colorare*

Soluția A	45 ml
Acid acetic glacial	6 ml
Formalină	6 ml

— După uscare, lamele se imersionează în emulsia nucleară pentru autoradiografie, apoi se usucă în curent de aer și se lasă pentru expunere, la 4°C, timp de 14 zile, după care sînt developate și examinate microscopic.

Durata meiozei și a spermatogenezei la șoarece este de aproximativ 23—24 de zile.

La hamsterul chinezesc, pentru studiul cronologic al meiozei (Utakoji, 1966); fiecare animal este injectat intraperitoneal cu timidină tritiată și timidină neradioactivă dizolvate în soluție Hank (tabelul nr. 6). Preparatele cromozomiale și autoradiografiile se fac după metodele convenționale.

Durata meiozei și a spermatogenezei la hamsterul chinezesc (similară cu cea de la șobolan și berbec) este de aproximativ 36—37 de zile, fără a include timpul de proliferare de la celulele spermatogoniale la spermatocitele preleptotenice. Acest timp se consideră a fi egal cu 1/4 din durata totală a spermatogenezei.

La femelă. În desfășurarea ovogenezei la mamifere se identifică trei stadii: — *stadiul predictiat* care cuprinde perioada de diferențiere timpurie a celulelor germinale, perioada de multiplicare și profaza tim-

Tabelul nr. 6

Marcarea *in vivo* a cromozomilor meiotici la hamsterul chinezesc

Intervalul dintre injectare și fixare	Injecția cu timidină ^3H + timidină rece	Expunerea autoradiografiilor	Succesiunea fazelor meiozei
4 ore	370 μc + 180 μg	1 lună	—
6 „	350 + 175	1 „	—
8 „	350 + 175	1 „	—
10 „	350 + 175	1 „	—
12 „	350 + 175	1 „	—
16 „	350 + 175	1 „	leptoten
18 „	350 + 175	1 „	leptoten
24 „	350 + 175	1 „	leptoten
2 zile	70 + 0	1 „	leptoten
3 „	70 + 0	1 „	zigoten
5 „	70 + 70	2 luni	pachiten timpuriu
7 „	70 + 70	2 „	„ „
10 „	50 + 50	70 zile	„ „
14 „	350 + 175	1 lună	pachiten tîrziu
18 „	350 + 175	1 „	„ „
20 „	50 + 50	70 zile	„ „
24 „	350 + 175	1 lună	spermatide
28 „	350 + 175	1 „	spermatide
30 „	50 + 50	70 zile	spermatide
35 „	350 + 175	1 lună	spermatozoizi
40 „	350 + 175	1 „	spermatozoizi

purie a meiozei (împerecherea cromozomilor, crossing-over și apariția chiasmelor); — *stadiul dictiat* în timpul căruia se observă creșterea asexuată a ovocitului în timpul maturării foliculului; — *stadiul postdictiat* care cuprinde, pe de o parte, maturarea preovulatorie a ovocitelor cu prima diviziune meiotică (reducerea complementului cromozomial diploid la complement haploid) și începutul celei de-a doua diviziuni de maturație, iar, pe de altă parte, ovulația și terminarea celei de-a doua diviziuni de maturație, după pătrunderea spermatozoidului în spațiul perivitelin.

Observații citologice privind ovogeneza la șoarece au condus la ideea că în *prometafaza I* se pot distinge 3 substadii: 1) stadiul de *masă cromatică* care se caracterizează prin condensarea materialului cromatic, la început invizibil și bine dispersat, în jurul macronucleolului devenind ușor colorat, foarte neregulat și zimțat; 2) *stadiul de tranziție* în timpul căruia aproximativ 15—20 de corpuri rotunde, aparent bivalenți, pornesc din masa cromatică; 3) *formarea fusului* cînd paralel cu suprafața celulei începe să se formeze fusul de diviziune, iar bivalenții se inseră între fibrele fusului.

În *metafaza I* se completează fusul, iar cromozomii se aranjează neregulat în placa ecuatorială. La nivelul bivalenților se observă umflături centrale de diferite mărimi care indică prezența chiasmelor în procesul de terminalizare.

În *anafaza I timpurie*, terminalizarea este completă și bivalenții se separă în univalenți care migrează spre polii fusului de diviziune. În *anafaza I tîrzie*, la mijlocul fusului începe să se formeze un corp, prin

îngroșarea fibrelor fusului. Peretele celular de lîngă corpul central se adîncește (se scobește) și fusul capătă o poziție verticală.

În *telofaza I*, corpul central se accentuează, devine mai gros, și este împins între ovocit și primul corp polar (globul polar) diferențiat în întregime. Rezultatul primei diviziuni de maturație este reducerea complementului $2n$ la n.

Prometafaza II prezintă toate substadiile. *Masa cromatică* rămîne în ovocit după dispariția fusului. În *stadiul de tranziție*, diadele se desprind din masa de cromatină, iar în stadiul de *formare a fusului* se formează un fus de diviziune mai lung și mai subțire.

În *metafaza II*, diadele se aranjează în placa ecuatorială, nu prezintă umflătură centrală, deoarece sînt univalenți, și, deci, nu prezintă chiasme. Ovulația se produce, în majoritatea cazurilor, în metafaza II, foarte rar (13 % din cazuri) în prometafaza II.

Anafaza II are loc în cîteva minute după pătrunderea spermatozoidului.

În *telofaza II* se formează din nou un corp central care este împins între ovocit și cel de-al doilea globul polar.

Ovogeneza la șoarece. Deoarece marcarea stadiilor meiotice s-a realizat în timpul unui ciclu ovarian desfășurat în condiții normale (perioada de oestrus), iar procesele de maturare au loc mai ales în timpul nopții cele mai multe investigații s-au făcut în condiții de inversie întuneric—lumină, perioada de întuneric fiind cuprinsă între orele 9 AM și 4 PM.

Tehnica de lucru:

— Femelele în oestrus au fost împerecheate cu masculi fertili din aceeași linie cu 4 1/2 ore înainte de mijlocul perioadei de întuneric.

— Se inspectează, pentru constatarea dopului vaginal, la fiecare jumătate de oră, și după formarea dopului se fixează ovarele la diferite intervale de timp.

S-au analizat ovocite neatretice de la 80 de femele din liniile BALB/Dg și 129/Dg împerecheate cu aproximativ 4 ore înainte de jumătatea perioadei de întuneric (tabelul nr. 7).

Tabelul nr. 7

Durata meiozei la șoarece

Timpul (ore)	Faza meiozei	Proporția celulelor
0—1	prometafaza I; cele mai multe ovocite în faza de tranziție	80 %
1—2	faza de formare a fusului	65 %
2—5	metafaza I; numărul ovocitelor este crescut în metafaza tîrzie	80 %, 70 % și 65 %
5—6	cele mai multe ovocite în anafaza I și telofaza I	
6 1/2—9 1/2	ovulația	
11	ovocit penetrat de spermatozoid, cu cromozomii în anafaza II	
26	zigot în prima diviziune de segmentație	

Durata aproximativă a fiecărui stadiu s-a calculat cu ajutorul frecvenţelor diferitelor stadii în care s-a aflat ovocitul. S-a constatat că cea mai lungă fază este metafaza I şi II (2 ore şi 50 minute şi 5 ore), iar cea mai scurtă anafaza I (18 minute). Date comparabile se pot obţine şi după inducerea ciclului prin injectare cu hormoni gonadotropi (la 4—5 ore după injecţie), iar pentru investigaţiile de mutageneză chimică, această metodă face posibilă tratarea ovocitelor, fără influenţarea rezultatelor prin injectarea unei doze mari de hormon.

La iepure, maturarea ovocitului nu se realizează spontan în cadrul unui ciclu, ci este indusă de stimulul împerecherii (ovulaţie violentă) sau prin injectare cu hormoni gonadotropi.

Ca şi la şoarece, se observă toate substadiile prometafazei cu deosebirea că la iepure înaintea stadiului de *masă cromatică* apar în nucleu 20 de condensări Feulgen + care se strîng în jurul macronucleolului şi formează *învelişul cromatic*.

S-au analizat 547 ovocite provenite de la 78 femele (tabelul nr. 8).

Tabelul nr. 8

Durata meiozei la iepure

Timpul de la împerechere (ore)	Faza meiozei
2 1/2	învelişul cromatic
3	masă cromatică
4—5	faza de tranziţie
5—6	formarea fusului
6—7 1/2	cele mai multe ovocite în metafaza I
7 1/2	anafaza I urmată de telofaza I
8—9 1/2	prometafaza II
10	ovulaţia urmată de metafaza II

La om, maturarea ovocitului nu poate fi observată în condiţii normale, ci numai după inducerea artificială cu gonadotropi, după eliberarea ovocitului din folicul şi după cultivarea lui *in vitro* (tabelul nr. 9).

Tabelul nr. 9

Durata meiozei la om

Timpul după cultivare (ore)	Faza meiozei
25—28	profază tîrzie — diachineză
30	dispare nucleolul, rămînînd un buchet strîns de cromozomi, sub formă de bastonaşe, comparabil cu masa cromatică
28—35	majoritatea ovocitelor au parcurs metafaza I
36—43	în aproape toate ovocitele s-a produs prima diviziune meiotică
După 38	majoritatea ovocitelor au eliminat primul globul polar; a început metafaza II
7—7 ore 25 minute după inseminare	spermatozoizii penetrează spaţiul perivitelin
11,5	se formează pronucleii

1.6. Determinarea cantitativă a ADN prin microfotometrie

Tehnica a fost descrisă prima dată de Pollister şi Ris (1947) şi se bazează pe două lucrări ale lui Feulgen şi Rossenbeck (1924) şi Caspersson (1958).

Microfotometrele sînt aparate care permit exprimarea cantitativă, prin criterii obiective, a intensităţii colorării unui material biologic, fie că este vorba de coloraţia lui naturală, fie pe baza unei reacţii histochimice.

Studiile de microfotometrie au arătat că spre sfîrşitul diviziunii celulare, în anafază şi telofază, precum şi în prima parte a interfazei, cantitatea de ADN per celulă este simplă (2C), în timp ce în ultima parte a interfazei şi la începutul diviziunii celulare, în profază şi metafază, ea este dublă (4C). Pe baza acestor cercetări s-a demonstrat că în interfază are loc un proces de biosinteză a ADN, care determină dublarea cantităţii iniţiale, pregătind astfel celula pentru diviziune, valorile fiind intermediare între 2C şi 4C. Determinînd frecvenţa celulelor aflate în faza G_1 (2C), în faza S (cu cantităţi variabile de ADN între 2C şi 4C) şi în faza G_2 (4C) se poate stabili durata ciclului mitotic la diferite organisme.

Cercetări recente de microfotometrie efectuate de Bennett şi Jellings (1975), Nagl şi Capesius (1976), Frish şi Nagl (1979) au semnalat în diferite ţesuturi şi organe existenţa unor devieri mari a cantităţii de ADN de la valoarea 2C. Astfel, în celulele antipodale ale ovulelor de la *Scilla* s-au constatat valori ale ADN de 512 C (Frish şi Nagl, 1979), iar în unele celule din glandele sericigene de la *Bombyx mori* de 524 C (Nagl, 1978). Variaţiile mai mici se pot datora replicării diferenţiate, iar nivelele mai înalte unor cicluri endomitotice. Asemenea fenomene au fost observate în cursul diferenţierii celulare la diferite animale în celulele glandelor salivare de la *Drosophila* şi alte diptere, în diferite ţesuturi somatice de la albine şi cosaşi, în cartilajul de la păsări, iar la plante în celulele ţesuturilor nutritive ale embrionului (trofoblaste, trofocite, suspensoare, endoderm), în culturi de ţesuturi vegetale etc.

Tehnica implică două etape importante: 1, identificarea ADN prin reacţia Feulgen; 2, determinarea cantitativă a ADN prin microfotometrie.

1.6.1. Identificarea ADN prin reacţia Feulgen

În condiţiile unei hidrolize acide blînde (fără depolimerizarea ADN) se solubilizează specific bazele purinice ale macromoleculei de ADN, prin ruperea legăturii N-glicozidice, şi se formează un acid apurinic. Se produce apoi o rearanjare intramoleculară cu desfacerea ciclului furanozic între carbonii 1 —4 astfel: la C_4 apare un hidroxil, iar la C_1 o grupare aldehidică. Fiecare moleculă de reactiv Schiff se uneşte cu două grupări aldehidice formate după hidroliza acidă a ADN, rezultînd un compus colorat roşu-violaceu care indică prezenţa ADN.

Specificitatea reacţiei Feulgen a fost demonstrată prin numeroase experienţe. Astfel, prin tratamentul materialului biologic după hidroliza

acidă cu reactivi care se combină cu aldehidele reacția Feulgen a fost negativă. Compusul colorat este diferit de reactivul Schiff, fapt demonstrat de absorbția diferită a luminii; reactivul Schiff are absorbția maximă cuprinsă între 560 și 570 mμ, iar compusul colorat de 550 mμ. Prin extracția ADN cu acid tricloracetic sau prin digestia cu dezoxiribonucleză, reacția Feulgen este abolită, în timp ce digestia cu alte enzime, ribonucleaze și proteaze nu influențează reacția Feulgen.

În funcție de materialul care trebuie examinat se fac frotiuri, în cazul țesuturilor fluide, secțiuni de material inclus în parafină sau preparate squash.

Colorația Feulgen pentru frotiuri de sînge. Frotiurile se usucă la aer.

Fixarea se realizează în metanol, timp de 30 secunde;

Hidroliza în HCl N, timp de 12 minute, la 56°C, sau 5 minute, la 60°C;

Spălarea în HCl N la temperatura camerei;

Colorarea se face cu reactiv Schiff, 1 oră, la temperatura camerei;

Spălarea în soluție de bisulfit de K timp de 1 minut.

Tehnica Caspersson (1958) de pregătire a materialului biologic pentru includere în parafină și colorare Feulgen

Fixarea. Piesele nu trebuie să fie mai groase de 1—2 mm, pentru a asigura o fixare rapidă și de bună calitate. Timpul de fixare nu trebuie să depășească 5 ore, deoarece anumiți constituenți chimici pot fi extrași și țesutul devine casabil. Fixarea se realizează prin trecerea succesivă, cîte o oră, a materialului în diferite soluții: 10 % formalină, alcool etilic absolut—acid acetic glacial (3 : 1), 10% formalină, alcool etilic absolut—acid acetic glacial (3 : 1), 50 % formalină. După fixare, țesutul poate fi păstrat temporar în alcool etilic 70°.

Includerea în parafină. Țesutul trebuie deshidratat prin trecerea succesivă în alcool de 70°, 85°, 95°, timp de 15 minute în fiecare baie, apoi se fac 4 spălări în alcool etilic absolut, timp de 15 minute fiecare. Se trece materialul în alcool etilic absolut — benzen (1 : 1), pentru 15 minute, și în benzen, 15 minute. Apoi piesele se împarafinează.

Secțiunile se taie, de diferite grosimi, la microtom, în funcție de mărimea nucleilor, de regulă 6—8μ. Pentru țesuturile poliploide cu nuclei de mărimi variabile se recomandă efectuarea unor secțiuni de grosimi variabile, care vor fi montate pe o lamă cu o secțiune standard de țesut cu conținut cunoscut de ADN.

Deparafinarea. Secțiunile în parafină se trec în xilol, apoi în alcool etilic de 95°, 80°, 70°, 50° și 30°, după care se spală în HCl N, la temperatura camerei.

Hidroliza se realizează în HCl, la 60°C, timpul mediu fiind de 12 minute (este necesar să se stabilească timpul optim de hidroliză pentru fiecare tip de țesut cu care se lucrează). După hidroliză, materialul se spală timp de cîteva minute în apă distilată.

Colorarea se face în reactivul Schiff, timp de două ore, la întuneric, apoi materialul se spală de cîteva ori prin treceri rapide în apă distilată. Urmează trei băi, de cîte 10 minute fiecare, în soluție de metabisulfit de K.

Înainte de *montarea preparatelor* în balsam de Canada, materialul va fi deshidratat prin treceri succesive în alcool etilic de 30°, 50°, 70°, 80° și 95° și trei băi de alcool etilic absolut. După trei băi în xilen preparatele se permanentizează.

1.6.2. Determinarea cantitativă a ADN

Principiul metodei. O regiune a cîmpului microscopic limitată de o diafragmă îngustă este proiectată pe o celulă fotoelectrică cu un multiplicator de electroni, curentul debitat de acesta, de ordinul a cîtorva microamperi, fiind măsurat de un dispozitiv electric.

În practică, microfotometrele diferă prin părțile lor mecanice și în special prin dispozitivul de reperare a regiunii explorate de fotometru. Toate microfotometrele, indiferent de tipul lor, posedă o sursă de lumină, filtre sau monocromator, microscop și un dispozitiv fotometric. De exemplu, la microfotometrul Lison 2, imaginea este proiectată pe un ecran cu ajutorul unui ocular lateral, într-o cameră obscură. Ecranul are un orificiu, de un anumit diametru, și în spatele lui se află celula fotoelectrică închisă etanș. Imaginea structurii care urmează să fie studiată trebuie să ajungă deasupra orificiului; se deschide fotocelula, care debitează un curent înregistrat de un microampermetru cu multiplicator de electroni, iar reperarea obiectului de măsurat se face rapid, aparatul fiind potrivit pentru măsurători în serie.

Metoda constă în analiza cantitativă a compusului colorat prin măsurarea cantității de lumină absorbită de acesta. Se pot face măsurători fotometrice în celule pînă la limita de rezoluție a microscopului. Din acest punct de vedere, microfotometria poate fi definită ca fotometria volumelor cuprinse între 10 și 10^{-9} μl. Sînt mai multe tipuri de microfotometre: care măsoară absorbția în lumină vizibilă, în ultraviolet și în infraroșu.

În determinările de microfotometrie se disting două etape: determinarea luminii transmise prin obiect și determinarea concentrației sau a cantității de substanță prin care s-a făcut transmisia luminii.

a) *Transmisia* este dată de relația:

$$T = \frac{I}{Io}$$

în care: T = transmisia luminii,

I = intensitatea fasciculului luminos după ce a traversat un obiect colorat;

Io = intensitatea fasciculului luminos după ce a traversat un cîmp alb (o parte din lamă și lamelă pe care nu există preparat sau cu preparat necolorat).

Măsurarea cantității Io este absolut necesară în vederea corectării pentru lumina pierdută prin reflexie și refracție, spre deosebire de lumina pierdută prin absorbția specifică a substanțelor colorate. Din considerente practice transmisia se exprimă în procente. De aceea, Io nu se măsoară în valoare absolută, fiind folosit pentru a se aduce aparatul de măsurat la diviziunea 100. $T = I/Io \times 100$. Aceasta se realizează pe cîmp alb, în funcție de tipul de aparat (electric sau optic), reducînd intensitatea luminii prin filtre sau diafragme.

b) *Determinarea concentrației sau a cantității de substanță* prin care s-a realizat transmisia luminii se face cu ajutorul relației:

$$E = -\log T = \log \frac{Io}{I}$$

în care: E = absorbția (extincția) sau densitatea optică.

Transformarea transmisiei în absorbție este necesar să se realizeze în acord cu legea Lambert-Beer:

$$E = c \cdot d \cdot \varepsilon$$

în care: E = absorbția probei;

c = concentrația substanței avînd dimensiunile $\frac{mol}{litru}$ sau $\frac{milimol}{cm^3}$ care dau aceleași valori numerice;

d = grosimea obiectului (preferabil în cm);

ε = absorbția molară a substanței avînd dimensiunile $\frac{cm^2}{milimol} = \frac{litru}{mol \cdot cm}$ și depinzînd de lungimea de undă la care este măsurată transmisia.

După legea Lambert-Beer, concentrația soluției poate fi determinată prin măsurarea absorbției:

$$c = \frac{E}{d \cdot \varepsilon}$$

în care: d = grosimea obiectului ce poate fi măsurată cu ușurință, iar valoarea ε pentru diferite substanțe este dată în tabele speciale cu care sînt dotate citofotometrele.

Pentru calculul absorbției din transmisie, probele trebuie să fie omogene, deoarece lipsa de omogenitate poate constitui o importantă sursă de erori în microfotometrie. Acest inconvenient este înlăturat prin tehnica de baleaj, care oferă date atît chimice (cantitatea unei substanțe), cît și morfologice privind distribuția acesteia în interiorul celulei sau al nucleului.

Pentru estimarea limitei de rezoluție, se transformă concentrația (c) în masă (m) în milimoli, conform relației:

$$m = c \cdot V = \frac{E \cdot V}{d \cdot \varepsilon} = \frac{E}{\varepsilon} \cdot a$$

în care: V = volumul, iar a = aria măsurată. Cea mai mică arie măsurabilă cu microscopul optic este $a = (0{,}25\ m\mu)^2 = 0{,}0625\ m\mu = 6{,}25 \cdot 10^{-10}\ cm^2$.

Absorbția molară maximă este:

$$\varepsilon = 5 \cdot 10^5 \frac{cm^2}{milimol}$$

Aceste valori ne dau limita teoretică de detecție a masei:

$$mMin = \frac{10^{-2} \cdot 6{,}25 \cdot 10^{-10}}{5 \cdot 10^5}\ milimol.$$

Aceasta reprezintă 10^{-7} pînă la 10^{-20} milimol, ceea ce înseamnă că în cazuri extreme pot fi detectate fotometric circa 600 molecule.

În practică, în cazul determinării cantității de ADN nuclear se efectuează media a trei măsurători per nucleu.

Bennett, Gustafson și Smith (1977) au studiat variația cantității de ADN nuclear în cadrul g. *Secale*, folosind următoarea tehnică de lucru: au fixat vîrfurile rădăcinilor de 1—2 cm lungime în alcool absolut — acid acetic glacial (3 :1) la temperatura camerei, timp de 20 de ore; hidroliza în HCl N, la 60°C, 10 minute; colorarea cu reactiv Schiff (pH 3,6), timp de 2 ore; materialul a fost trecut apoi de trei ori, pentru 10 minute, în apă sulfuroasă; vîrfurile rădăcinilor au fost excizate și s-au efectuat preparate squash în acid acetic 45 %.

Estimarea conținutului de ADN s-a făcut cu microfotometrul Vickers M 86 în intervalul de 3—5 ore de la efectuarea preparatelor. S-au

măsurat cîte 10 nuclei de pe fiecare din cele trei lame efectuate pentru fiecare specie. Absorbția fiecărui nucleu a fost estimată făcînd media a trei citiri. Toate rezultatele obținute în unități arbitrare de absorbție relativă au fost transformate în valori absolute folosind *Secale cereale*, soiul *Petkus Spring* ca standard (4C = 33,14 pg după Bennett și colab., 1977) (tabelul nr. 10).

Tabelul nr. 10

Cantitatea de ADN (în picograme) per nucleu 4C în cadrul g. *Secale* (după Bennett și colab., 1977)

Speciile	Media	Semnificația*)
S. cereale ssp. *cereale* „Petkus Spring"	33,14	standard
S. cereale ssp. *ancestrale*	31,75	* *
S. cereale ssp. *segetale*	32,78	n.s.
S. silvestre	28,85	* * *
S. africanum	29,68	* * *
S. montanum ssp. *montanum*	32,82	n.s.

*) Estimarea semnificației s-a făcut prin calcularea diferenței limită pentru granițele de semnificație de 5% și de 0,1% notate cu asterixuri; n.s. = nesemnificativ.

După Greilhuber (1979), estimarea cantității de ADN nuclear la *Adoxa moschatellina* ($2n = 4x = 36$), se face astfel: se fixează rădăcinile în metanol: acid acetic glacial (3 : 1); în același mod se fixează și rădăcinile de *Allium cepa* „Ailsa Craig" ca standard (după Bennett și Smith, 1976). Hidroliza se face în 5 N HCl, la 20°C, 5 minute. Colorarea cu reactiv Schiff, timp de o oră, apoi spălare de cîteva ori în apă sulfuroasă (30 minute). Preparatele se fac prin metoda squash în acid acetic 45 %. Pentru permanentizare, lamelele se detașează cu gheață carbonică și se deshidratează în alcool etilic absolut. Montarea se face în euparal. Autorul a măsurat cantitatea de ADN în nucleii din telofaza tîrzie.

Pentru calcularea cantității absolute de ADN la o anumită specie, dacă se consideră valoare standard 2C ADN de la *Allium cepa* (A. c.) „Ailsa Craig" = 33,5 pg, Nagl (1978) propune următoarea formulă:

$$2C \text{ (pg)} = 33{,}5 \times \frac{\text{Extincția}}{\text{Extincția A.c.}}$$

Bennett și Smith (1976) apreciază că, în comparație cu estimările exprimate în unități absolute, cantitatea relativă de ADN a unei specii exprimată în unități relative are o utilizare foarte limitată (tabelul nr. 11). Aceasta necesită un efort suplimentar, constînd în includerea, în fiecare

experiment, de una sau mai multe specii-standard a căror medie a ADN este deja cunoscută.

Tabelul nr. 11

Cantitatea de ADN 4C la 8 specii de angiosperme folosite ca standard

Speciile	Nr. de cromozomi	ADN 4C pg
Triticum aestivum, Chinese spring	$2n = 6x = 42$	69,27
Allium cepa, Ailsa Craig *	$2n = 2x = 16$	67,00
Vicia faba (P.B.I. linia 6) **	$2n = 2x = 12$	53,31
Anemone virginiana, linia AV 200	$2n = 2x = 16$	35,67
Secale cereale, Petkus Spring	$2n = 2x = 14$	33,14
Hordeum vulgare, Sultan	$2n = 2x = 14$	21,89
Pisum sativum, Minerva Maple	$2n = 2x = 14$	19,46
Senecio vulgaris, populație P.B.I. **	$2n = 4x = 40$	5,88

* Valoarea 2C ADN de la *Allium cepa* = 33,5 pg va da o valoare 4C de 67,0 pg.

** Plant Breeding Institute, Cambridge.

2 Metode pentru studiul cromozomilor la plante

Metodologiile de studiu al cromozomilor permit : determinarea numărului, formei şi mărimii cromozomilor în mitoză şi alcătuirea cariotipului speciei respective ; efectuarea de studii de citotaxonomie comparată şi resinteză artificială a unor specii ; studiul aberaţiilor cromozomiale ; determinarea gradului de ploidie al organismelor ; analiza meiozei ; studiul organismelor aneuploide şi al modului de plasare a genelor pe cromozomi ; determinarea structurii fine a cromozomilor şi a modelelor de bandare ; evidenţierea structurii spiralizate a cromozomilor ; evidenţierea organizării supracromozomiale.

2.1. Metode pentru evidenţierea cromozomilor în mitoză

Aceste metode se bazează pe colorarea ţesuturilor incluse în parafină şi secţionate la microtom sau pe colorarea lor directă şi efectuarea de preparate squash.

2.1.1. Metoda de includere în parafină, secţionare şi colorare a cromozomilor

Metoda, elaborată iniţial de Newton (1927), foloseşte colorantul violet de genţiană, care se fixează exclusiv pe cromozomi, astfel că aceştia apar coloraţi violet strălucitor pe un fond citoplasmatic perfect incolor. Ulterior însă, fără modificări ale procedurii de includere în parafină şi secţionare, colorantul s-a înlocuit cu fucsină bazică (reactivul Schiff), care colorează cromozomii în roşu-violaceu.

Pentru studierea cromozomilor în mitoză şi pentru numărarea lor se folosesc ţesuturi meristematice în care un număr însemnat de celule se află în diviziune. Pentru secţionarea materialului este necesară includerea acestuia în parafină ; parafina nu intră în ţesuturi, deoarece acestea conţin o cantitate mare de apă, care nu este miscibilă cu parafina. Din acest motiv, ţesuturile fixate trebuie tratate progresiv cu alcool, pînă ce acesta înlocuieşte complet apa, apoi cu toluen care este miscibil

cu alcoolul (pe care îl înlocuieşte) şi totodată un solvent foarte bun al parafinei. Toluenul este înlocuit apoi cu parafină. Ulterior, pentru colorarea secţiunilor trebuie îndepărtată parafina din ţesuturi, deoarece soluţia de violet de genţiană 1 % este preparată cu apă, care nu este miscibilă cu parafina. De aceea, secţiunile de pe lamă trebuie să străbată drumul invers, adică mai întîi sînt introduse în toluen, care dizolvă parafina, apoi toluenul este înlocuit de alcool şi acesta de apă.

După colorare este necesară montarea în balsam de Canada, răşină cu un indice de refracţie foarte apropiat de al sticlei, insolubilă în apă şi alcool, dar solubilă în toluen. Pentru aceasta, lamele cu secţiuni colorate sînt trecute mai întîi în iod în iodură de potasiu, folosit ca mordant pentru fixarea mai bună a colorantului, apoi în alcool, ce înlocuieşte apa din ţesuturi, şi în toluen.

Tehnica de lucru :

Fixarea se efectuează în mici fiole de sticlă în care se pun 1—2 ml din fixatorul Navaşin (1926). În fiole se introduc vîrfurile rădăcinilor, în lungime de 8—10 mm ; deşi ţesutul meristematic se află pe o porţiune mult mai redusă la vîrf, este necesar ca rădăcinile să aibă o lungime mai mare pentru a putea fi manipulate mai uşor.

Fixatorul Navaşin se prepară astfel :

— 10 ml acid cromic 1‰ (1 g anhidridă cromică la 1 000 ml apă distilată)

— 4 ml formol 10 %

— 1 ml acid acetic pur.

Materialul rămîne în fixator 24 de ore, apoi se trece în apă distilată sau apă de robinet pentru 1—2 ore (în acest timp apa se schimbă de 2—3 ori). Conservarea materialului se face în alcool etilic 60° sau 70° la frigider.

Deshidratarea se face treptat prin înlocuirea apei din fiole cu alcool etilic şi toluen, astfel : o oră alcool 80°, o oră alcool 90°, o oră alcool 95°, o oră alcool 100°, o oră alcool 100°, o oră alcool 100°, o oră alcool 100° + toluen (50 % + 50 %) şi o oră toluen 100 %.

Includerea în parafină. Se prepară un amestec în proporţii egale de toluen şi parafină pură filtrată şi se lasă la 60°C. După ultimul pasaj în toluen se procedează astfel :

— Rădăcinile se ţin în acest amestec o noapte, 60°C, apoi în 1—2 băi de parafină pură, timp de 6—12 ore, tot la 60°C.

— Pe o placă încălzită se pregătesc sticle de ceas unse cu albumină glicerinată în care se pune parafină pură, păstrată la 60°C.

— Maximum 3—4 rădăcini se aşază în linie dreaptă, în parafină, pe fiecare sticlă de ceas.

— Se lasă să se răcească, apoi se introduce într-un vas cu apă rece. Se lasă cîteva minute.

— Se desprind blocurile de parafină, se etichetează şi se pot păstra mai mult timp.

Executarea secțiunilor. Se fixează microtomul în funcție de grosimea secțiunilor (μm), care depinde de lungimea cromozomilor sau de diametrul celulelor din țesutul studiat (tabelul nr. 12).

Tabelul nr. 12

Grosimea secțiunilor (după Darlington și La Cour, 1976)

Țesutul	Lungimea cromozomilor	
	1—10 μ	15—40 μ
Celule meristematice	4—16	20—40
Celule-mamă ale polenului	14—20	30—40
Celule-mamă ale sacului embrionar	20—30	40
Polen și ovule	9—16	20—40

— Secțiunile se întind pe lama unsă cu albumină glicerinată, în ordinea secționării (cîte 10—15 secțiuni).

Albumina glicerinată se prepară în felul următor: se iau 50 ml albuș de ou proaspăt la care se adaugă 50 ml glicerină și 1 g salicilat de sodiu. Se pune amestecul într-un vas și se agită puternic pînă ce în suspensie apar numeroase bule de aer. Spuma de albuș de ou care apare deasupra se îndepărtează și restul se filtrează printr-o bucată de pînză. Datorită salicilatului de sodiu albumina glicerinată se conservă bine chiar la temperatura camerei.

— Se adaugă pe lamă o picătură de apă pentru întinderea secțiunilor, se încălzește lama pe placă încălzită și se aliniază secțiunile. Se absoarbe surplusul de apă.

— Se pun lamele în etuvă la 60°C pentru cel puțin o zi (24—48 de ore).

Deparafinarea se face prin trecerea lamelor prin 3 băi de toluen, cîte 10 minute în fiecare baie, și 4 băi de alcool etilic (100°, 95°, 80°, 70°), cîte 5—10 minute în fiecare. Apoi lamele sînt trecute în apă distilată pentru rehidratare, unde pot rămîne cîteva ore.

Hidroliza se face în HCl 1N rece, 1 minut, apoi în HCl 1N la 60°C, 10 minute, și din nou în HCl 1N rece, 1 minut. După hidroliză, lamele se clătesc în apă distilată.

Colorarea se face în reactivul Schiff, timp de 2—6 ore. După colorare, lamele se clătesc în 3 băi de apă sulfuroasă, cîte 2 minute fiecare.

Apa sulfuroasă se prepară cînd este nevoie din:

Apă distilată . . . . . 200 ml
HCl 1N . . . . . 20 ml
Metabisulfit de potasiu sau natriu . . . . 1 g

Apoi, lamele se spală în apă curentă, 2 ore.

Montarea preparatelor se face în balsam de Canada. Pentru aceasta, mai întîi preparatele se trec rapid prin 3 băi de alcool etilic (95°, 100° și 100°) cîte 5—10 minute și prin 3 băi de toluen. Montarea se face într-o picătură de balsam de Canada.

În ultima vreme, metoda de includere în parafină a țesuturilor și de colorare a cromozomilor cu violet de gențiană sau fucsină bazică se utilizează într-o măsură mai redusă în lucrările de citogenetică, fiind înlocuită cu o seamă de metode rapide, cu rezultate foarte bune. Dintre acestea, cea mai des utilizată este metoda Feulgen.

2.1.2. Metoda Feulgen de colorare a cromozomilor pe preparate squash

Această metodă a fost elaborată de Feulgen și Rossenbeck (1924) și modificată de De Tomasi (1936). În histochimie, reacția Feulgen pozitivă este considerată ca fiind un indice sigur al prezenței ADN.

Pentru studiul cromozomilor în mitoză la plante, în general, se folosesc rădăcini meristematice, obținute prin germinarea semințelor în vase Petri sau de la plante în ghivece. Rădăcinile trebuie să atingă lungimea de 1—3 cm, iar recoltarea se face de obicei dimineața.

Tehnica de lucru:

Prefixarea materialului are rolul de a inhiba formarea fusului nuclear, determinînd acumularea de metafaze și de a contracta ușor cromozomii. Pentru prefixare se poate folosi una din următoarele soluții (concentrația și timpul de tratament se determină prin tatonări la fiecare specie):

— colchicină 0,05% sau 0,1%, 2 sau 3 ore;
— emulsie de α-bromnaftalen, 4 sau 5 ore;
— 8-hidroxiquinoleină 0,002M sau 0,02M, 3 sau 4 ore, la 15°C;
— apă rece la 1—2°C, 24 de ore la frigider.

Emulsia de α-bromnaftalen se prepară astfel: într-o sticlă cu dop rodat se pun 75% apă distilată și 25% α-bromnaftalen, se agită puternic și se lasă cîteva minute ca excesul de substanță să se depună la fundul sticlei. Se ia cu o pipetă emulsia din partea superioară și se pun cîte 2—3ml în mici fiole de sticlă în care se găsesc vîrfurile de rădăcini.

Fixarea se face cu una din următoarele soluții (fixatori):

— acid acetic glacial 45% (acid acetic 45% și apă distilată 55%)
— alcool etilic absolut: acid acetic glacial 3 : 1
— alcool metilic: acid acetic glacial 3 : 1
— fixatorul Carnoy — alcool etilic absolut: acid acetic glacial: cloroform pur 6 : 1 : 3
— fixatorul Östergren și Heneen:

Metanol . . . . . 60 ml
Cloroform . . . . . 30 ml
Apă distilată . . . . . 20 ml
Acid picric . . . . . 1 g
2-4-dinitrofenol . . . . . 1 g
Clorură mercurică . . . . . 1 g

— fixatorul Pienaar — alcool metilic: cloroform pur: acid propionic 6 : 3 : 2.

Din fiolele cu rădăcini se îndepărtează soluția de prefixator și se pun 2—3 ml fixator, apoi fiolele se introduc în frigider, lăsîndu-se pînă a doua zi dimineața. Pentru conservarea mai îndelungată a materialului fixatorul este înlocuit cu alcool etilic 70°.

Hidroliza are rolul de a asigura macerarea țesuturilor, prin dizolvarea parțială a substanțelor pectice, și de a elibera grupele aldehidice din ADN. Hidroliza permite, deci, etalarea materialului și ajută la colorarea sa. Se realizează cu HCl 1N, care se prepară astfel: HCl pur (d = 1,19) 82,5 ml și apă distilată 1 000 ml.

Din fiole se îndepărtează fixatorul și se pun 2—3 ml HCl 1N, la 60°C. Fiolele se introduc apoi într-un termostat reglat la 60°C, unde se lasă un timp variat, de ex., 12 minute în cazul rădăcinilor de grîu, secară sau bob, 6—14 minute la alte specii, depinzînd de duritatea țesuturilor.

Colorarea constă în producerea unei reacții chimice între grupele aldehidice din ADN eliberate prin hidroliză și fucsina bazică, din care rezultă o colorație roșie-violacee a cromozomilor. Se efectuează cu soluția de fucsină bazică decolorată (reactivul Schiff) care se prepară astfel:

— Într-un balon de sticlă se pune 1 g fucsină bazică sub formă de cristale sau pudră.

— Peste această pudră se pun 200 ml apă distilată la 100°C, se agită puternic și se lasă să se răcească la 50°C.

— Se filtrează și se adaugă apoi 30 ml HCl 1N.

— Se adaugă 3 g metabisulfit de potasiu, sub formă de cristale (se evită preparatul sub formă de pudră care se alterează repede prin pierdere de SO_2).

— Se lasă soluția 24 de ore într-o sticlă bine închisă, la întuneric și la rece; soluția capătă o culoare gălbuie deschis.

— Pentru decolorarea soluției se adaugă 0,5 g cărbune vegetal, se lasă aproximativ 1 minut și se filtrează repede printr-o hîrtie de filtru. Soluția se poate păstra timp îndelungat la întuneric și la rece (4°C). Dacă nu este păstrată la rece se observă, mai ales vara, că începe să se recolo-reze. Pentru a evita recolorarea se adaugă 2—4 g metabisulfit de potasiu.

După terminarea hidrolizei se îndepărtează HCl 1N din fiole și se adaugă 2—3 ml din reactivul Schiff. După 10—15 minute, regiunea meristematică din vîrful rădăcinilor începe să se coloreze în roșu-violaceu. Restul rădăcinilor, unde frecvența diviziunilor este redusă, iar celulele sînt mari și alungite, rămîne aproape complet necolorat.

Pentru intensificarea colorării, rădăcinile se lasă în soluție timp de o jumătate de oră pînă la 2 ore, după care se poate începe efectuarea preparatelor și observarea la microscop. Uneori se recomandă ca pentru intensificarea contrastului de culoare dintre cromozomi și citoplasmă rădăcinile să fie trecute pentru o jumătate de oră în apă.

Preparatele microscopice se fac prin etalarea materialului după metoda squash pe o lamă într-un strat subțire, pe cît este posibil format dintr-un singur strat de celule. Practic se procedează astfel:

— Într-o picătură de acid acetic glacial 45% se taie vîrful meristematic colorat.

— Peste acesta se pune o lamelă, care a fost unsă cu o peliculă de albumină glicerinată și trecută repede prin flacăra unei lămpi de spirt,

pentru coagularea albuminei; albumina glicerinată împiedică eventuala dispersare a cromozomilor din celulă, prin fixarea lor pe stratul de albumină (folosirea albuminei nu este obligatorie).

— Cu un bețișor de lemn se lovește sistematic în lamelă pînă ce se realizează o etalare cît mai bună a materialului; se absoarbe excesul de acid acetic cu hîrtie de filtru.

Un bun preparat microscopic trebuie să prezinte nucleii și cromozomii colorați intens în roșu-violaceu, iar citoplasma incoloră, celulele să fie bine etalate, astfel încît cromozomii să fie bine dispersați să poată fi observați individual.

Materialul colorat după metoda Feulgen poate fi păstrat în reactivul Schiff, la temperatură scăzută în frigider, 1—3 zile.

2 1.3. Cîteva recomandări pentru speciile cu cromozomi mici și greu colorabili

— În general, pentru speciile cu cromozomi mici se folosește ca prefixator α-bromnaftalen sau 8-hidroxiquinoleina; în cazul în care se folosește α-bromnaftalen, pentru obținerea unei emulsii mai fine, deci mai concentrate, se adaugă 1% saponină și se agită bine.

— La speciile la care țesuturile sînt mai dure și cromozomii se colorează greu se aplică tratamente enzimatice, în general după fixare. Acestea constau în imersionarea rădăcinilor într-o soluție de pectinază 1% și celulază 1% în amestec (1 : 1) și menținerea lor 30 minute — 1 oră, la 37°C. Acest tratament ajută la pătrunderea colorantului și înmuierea țesutului. Se recomandă folosirea pectinazei din *Aspergillus niger*.

— Dacă colorarea cu reactivul Schiff nu este satisfăcătoare, preparatul poate fi efectuat într-o picătură de carmin acetic sau orceină acetică în loc de acid acetic 45%. Apoi se poate trece lama de cîteva ori prin flacără, evitînd fierberea. După etalare, preparatul mai poate fi lăsat 15—30 minute, pentru intensificarea colorării, înainte de a fi observat la microscop.

Se poate încerca, de asemenea, pentru materialele care se colorează greu, efectuarea unei hidrolize, concomitente cu colorarea, într-un amestec de HCl 1N : carmin acetic (1 : 9).

Soluția de carmin acetic se prepară astfel:

Apă distilată	55 ml
Acid acetic glacial	45 ml
Carmin	2,2 g

Ingredientele se pun într-un balon de sticlă cu reflux, se agită bine pentru dizolvarea carminului și se fierb la foc mic circa 30 minute. Se agită din nou și se lasă să se răcească. Se filtrează și se pun cîteva cristale de acetat de fier. Se agită din nou. Soluția astfel pregătită reprezintă *soluția de rezervă 2%*.

Din aceasta se poate pregăti o *soluție standard 1%*, de lucru, prin diluare:

Soluție de rezervă	45 ml
Apă distilată	55 ml

Se pot utiliza şi concentraţii mai mari (3 %, 4 %) în funcţie de necesităţi.

Soluţia de orceină acetică se poate pregăti după aceeaşi schemă.

2.2. Metode pentru evidenţierea cromozomilor în meioză

2.2.1. Metoda carmin acetică

Această metodă se foloseşte pentru depistarea stadiului meiotic în care se găseşte materialul ce urmează a fi fixat sau pentru colorarea materialului fixat, fără hidroliză, la speciile la care această colorație este satisfăcătoare.

Tehnica de lucru. În general, meioza are loc în momentul cînd anterele tinere îşi pierd transluciditatea. La grîu, de exemplu, meioza se produce cînd spicele sînt în burduf şi au o lungime de 4 —6 cm.

— Pentru reperarea acestui moment, se aleg spicele în burduf de aceeaşi lungime şi se scot cele 3 stamine dintr-o floare.

— Una dintre aceste stamine se pune pe o lamă într-o picătură de soluţie carmin acetică, se taie transversal la mijloc cu un ac spatulat şi apoi se apasă încet pe cele două jumătăţi pentru a goli antera de conţinut (celulele-mamă ale grăunciorilor de polen).

— Peste acest material se pune o lamelă şi cu o bucată de hîrtie de filtru se apasă pentru a etala bine celulele şi pentru a îndepărta excesul de colorant. Se poate observa imediat la microscop deoarece colorarea are loc foarte repede. Dacă celulele se află în diviziune în metafaza I a meiozei, atunci celelalte două stamine din aceeaşi floare se pun în fixator (alcool etilic : acid acetic glacial 3 : 1). În caz că celulele se află într-o altă fază atunci se caută alte flori spre bază sau spre vîrful spicului. În general se consideră că staminele din aceeaşi floare se află în aceeaşi fază de diviziune. Uneori, cînd nu este timp sau nu sînt condiţii pentru observarea la microscop a unei stamine, se poate pune în fixator întregul spic.

— Se poate încerca şi colorarea materialului fixat prin metoda carmin acetică. Dacă rezultatele nu sînt bune, se foloseşte metoda Feulgen.

2.2.2. Metoda Feulgen

Pentru recoltarea materialului se procedează la fel ca în metoda carmin acetică.

Fixarea se efectuează în fiole de sticlă în care se pun 2 —3 ml fixator (alcool etilic — acid acetic 3 : 1), în care se ţin anterele cel puţin o oră la temperatura camerei sau cel mult 24 —48 de ore în frigider după care se trec în alcool etilic absolut pentru o jumătate de oră, pentru îndepărtarea acidului acetic din ţesuturi. Materialul se trece în fiole cu alcool de

70 %, care se închid ermetic prin parafinare, şi se pun în frigider la 0 —4°C unde se pot păstra timp îndelungat. Dacă materialul se păstrează în alcool de 70° se poate renunţa la trecerea prin alcool absolut.

Hidroliza. Materialul se scoate din alcool de 70° după ce a stat cel puţin o jumătate de oră şi se spală cu apă, pentru îndepărtarea alcoolului, se pune apă şi se agită anterele pînă ce cad la fund. Materialul se lasă în apă o jumătate de oră, după care se face hidroliza în HCl N, la 60°C, timp de 8 —9 minute la grîu, 9 —10 minute la porumb, 10 minute la pepenele verde, 12 minute la orz etc.

Colorarea se face în soluţie de fucsină bazică (reactivul Schiff) în care materialul se lasă cel puţin o jumătate de oră, după care se fac preparatele microscopice.

Preparatele microscopice se fac astfel : pe o lamă se pune o picătură de acid acetic 45 % în care se pune o stamină. Cu un ac spatulat, se taie transversal stamina în două jumătăţi, se apasă uşor pînă ce ies celulele-mame ale grăunciorilor de polen şi apoi se îndepărtează sacii polinici. Peste material se pune o lamelă unsă cu albumină glicerinată şi trecută prin flacăra unei lămpi de spirt. Cu o bucată de hîrtie de filtru se apasă pentru etalarea celulelor şi pentru îndepărtarea excesului de soluţie. Pot fi făcute preparate semipermanente sau permanente.

2.3. Tehnici pentru realizarea de preparate semipermanente şi permanente

Preparatele semipermanente pot fi făcute prin parafinarea marginilor lamelei sau aplicarea de soluţie de lipit cauciuc, pentru a împiedica evaporarea acidului acetic 45 % sau a colorantului; soluţia de lipit cauciuc prezintă avantajul că poate fi uşor îndepărtată. Preparatele pot fi astfel păstrate cîteva zile la frigider.

Preparate permanente se pot face prin montarea materialului în euparal, balsam de Canada sau eukitt.

Tehnica de lucru. Este necesară desprinderea lamelei de lamă în aşa fel încît materialul să rămînă în mare parte pe lamă. Pentru aceasta se folosesc mai multe procedee :

1. Desprinderea lamelei într-o baie de acid acetic 45 %, într-un vas Petri în care se pune lama orientată cu lamela în jos şi cu ambele capete sprijinite pe baghete de sticlă pentru a lăsa loc de cădere a lamelei.

2. Desprinderea lamelei într-o baie de alcool etilic absolut (se procedează ca în cazul precedent).

3. Desprinderea lamelei la —20°C. Se pune lama cu lamela în jos în congelatorul unui frigider, se lasă 1 —2 minute pînă îngheaţă şi cu ajutorul unei lame de bărbierit se aruncă lamela cu o mişcare rapidă şi precisă, fără a aluneca lamela deasupra lamei.

4. Desprinderea lamelei prin îngheţare cu zăpadă carbonică (Conger şi Fairchild, 1953). Pentru aceasta se îngheaţă lama cu un jet de zăpadă carbonică, timp de 30 secunde, sau zăpada carbonică se scoate într-un săculeţ special, apoi într-un termos şi pe măsură ce lamele sînt făcute se

pun cu lamela în jos pe stratul de zăpadă. În ambele cazuri, după înghețarea lamei urmează desprinderea lamelei cu ajutorul unei lame de bărbierit.

Indiferent prin ce procedeu se face desprinderea lamelei, după această operație, lama se trece prin 1—2 băi de alcool etilic 95° sau 100°. Se lasă să se usuce la aer, acoperită de praf. A doua zi se pune pe lamă o picătură de euparal sau balsam de Canada sau eukitt și se acoperă cu o lamelă curată. Se lasă să se usuce cîteva zile, după care lamele pot fi observate la microscop și păstrate timp îndelungat.

2.4. Metode de bandare

Metodele de bandare permit studiul structurii fine a cromozomilor. Acestea constau în colorarea diferențiată a unor benzi alternative, mai intens sau mai palid colorate, corespunzătoare unor tipuri diferite de cromatină. Modelele de benzi sînt caracteristice unei specii, sînt aceleași pentru țesuturi diferite în cadrul unei specii și nu se schimbă în timpul dezvoltării.

Metodele și în consecință benzile pot fi clasificate după coloranții folosiți sau după segmentele cromozomiale evidențiate. Astfel, există cel puțin 6 grupe de metode de bandare și respectiv tipuri de benzi : *Q* (quinacrină), *G* (Giemsa), *R* (de reversie), *T* (telomerice), *F* (Feulgen), *C* (centromerice), *N* (organizatorul nucleolar), *Cd* (kinetocori).

Dacă însă, benzile cromozomiale sînt clasificate conform caracteristicilor lor intrinsece și nu după coloranți sau segmentele cromozomiale evidențiate, se disting numai trei tipuri de benzi : benzi heterocromatinice constante, benzi heterocromatinice fluctuante și benzi Cd-kinetocori.

Benzile heterocromatinice constante sînt echivalente cu benzile evidențiate prin metodele C, G-11, N și T. Aceste benzi sînt vizibile în interfază și în toată diviziunea și sînt relativ constante ca mărime. Conform definiției clasice a heterocromatinei, ele nu decondensează în interfază și nu reprezintă, în mod necesar, toate regiunile heterocromatinice de pe cromozomi. Sînt grupe de organisme (plantele) la care nu se evidențiază alt tip de benzi decît acestea.

Benzile heterocromatinice fluctuante sînt echivalente cu benzile evidențiate prin metodele G, Q și R. Aceste benzi nu se disting în timpul interfazei, în prometafază au aspectul unor puncte care încep să fuzioneze, iar în metafază apar benzile întunecate. Astfel de benzi sînt prezente la mamifere, păsări și reptile. La plante, modelul de benzi G nu poate fi demonstrat și se pare că benzile C corespund cu benzile Q, iar la animale, benzile G corespund cu benzile Q.

Benzile Cd („centromere dots") sînt benzi ce apar la începutul mitozei și dispar la sfîrșitul ei. Mărimea și distribuția lor corespund cu kinetocorii.

Imposibilitatea demonstrării benzilor G în cromozomii plantelor se pare că este datorată gradului lor mare de contracție (Greilhuber, 1979). De exemplu, contracția cromozomului mitotic la *Ornithogalum virens* este de 16,5 ori mai mare decît a cromozomului mitotic uman; la aceeași specie, lungimea cromozomului pachitenic este de 13,3 ori mai

mare decît cea a cromozomului mitotic, în timp ce la om este de numai 2,3 ori mai mare. De asemenea, distanța cromomerică în pachiten este de 1,43 μm la om și 0,89 μm la *Ornithogalum*.

2.4.1. Metode de bandare Q (benzi Q)

În anul 1968, Caspersson și colaboratorii săi au colorat cromozomii la plante și la hamsterul chinezesc cu ajutorul mustarului de quinacrină, agent alkilant și fluorescent în același timp. Pe lamele astfel colorate s-a observat cu ajutorul microscopului în ultraviolet o alternanță între benzile luminoase, fluorescente, și benzile întunecate, pe toți cromozomii. Această alternanță se datorează fixării selective a fluorocromului pe anumite regiuni ale cromozomului.

La mamifere, benzile Q formează un model distinctiv și unic pentru fiecare cromozom (Conferința de la Paris, 1971).

La plante sînt mai puține cercetări în acest sens. Caspersson (1969) și Canio Vosa (1970) au arătat că la plante nu s-a putut descrie un model unic și distinctiv al unui cariotip cu ajutorul benzilor Q. Modelul de benzi Q poate fi caracteristic numai pentru cîteva segmente de cromozomi, nu pentru întreg cariotipul. La unele specii, modelul de benzi Q corespunde cu modelul de benzi C (heterocromatina centromerică) (Vosa și Marchi, 1972).

Dificultățile metodelor de bandare Q la plante constau în faptul că pentru reușita bandării toți cromozomii trebuie să fie bine separați de citoplasmă. Or, aceasta se obține cu ajutorul hidrolizei cu HCl, tratament prin care cromozomii devin fluorescenți în mod uniform. Din acest motiv, hidroliza cu HCl s-a înlocuit cu tratamentul cu acid acetic 45 %. Dacă se cunoaște bine cariotipul speciei, pot fi folosite fotografii ale diferitelor plăci metafazice, pentru a identifica fiecare cromozom și pentru a obține astfel un model de bandare complet.

Metoda de bandare Q la *Vicia faba* (după Caspersson, Zech și Modest, 1969)

— Semințele se pun la germinat la 20 ± 2°C; rădăcinile primare sînt eliminate cînd ating lungimea de 1 cm, pentru a permite creșterea rădăcinilor secundare. De obicei, experiențele la *V. faba* se fac cu rădăcini secundare pentru a înlătura frecvența mare a aberațiilor cromozomiale spontane din rădăcinile primare.

— Vîrfurile de rădăcini secundare sînt tratate cu soluție de colchicină 0,1 %, 3 ore la întuneric.

— Fixarea se face în alcool etilic absolut : acid acetic glacial (3 : 1), 15 minute, după care rădăcinile se clătesc în alcool etilic absolut în care se și păstrează la 4°C, pînă la folosire. Cromozomii se prepară prin tehnica squash într-o picătură de acid acetic 45 %, iar lamelele sînt îndepărtate prin tehnica gheții uscate. Lamele se trec prin alcool etilic absolut la 4°C și se păstrează pînă la folosire.

— Lamele sînt transferate din alcool etilic absolut, prin băi succesive de alcool şi tampon (Mac-Ilvaine — fosfat disodic/acid citric pH 4,1), în soluţia de colorare. Concentraţia standard a fluorocromului este de 50 μg/ml apă, însă cînd fluorocromii au o solubilitate redusă s-a folosit o soluţie apoasă de 50% alcool etilic sau acetonă, iar concentraţia fluorocromului a ajuns pînă la 500 μg/ml. Colorarea în soluţie de fluorocromi durează 20 minute la 20°C.

— Apoi lamele sînt spălate de 3 ori în tampon Mac-Ilvaine şi montate în acelaşi tampon (pH 4,1 — optim pentru *V. faba*). Soluţia tampon dă benzilor fluorescente mai multă luminozitate, în special pe cromozomii S (fig. 8). Pentru prevenirea uscării lamelor în timpul examinării la microscop, marginea lamelei se lipeşte cu soluţie de lipit cauciuc.

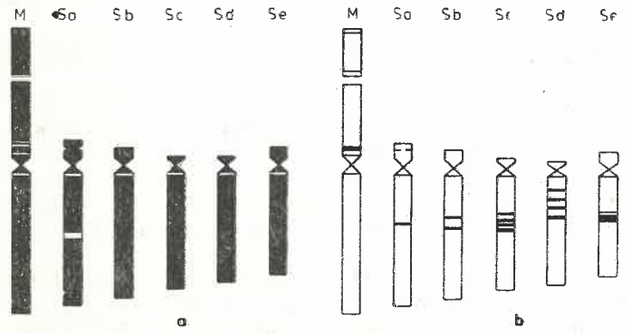


Fig. 8. — Modelul de benzi Q (a) şi G (b) la *Vicia faba* (după Vosa şi Marchi, 1972).

Vizualizarea lamelor colorate cu fluorocromi se face la un microscop cu fluorescenţă. Pentru microfotografiere se foloseşte, de asemenea, film special (Kodak Panatomic-X sau Kodak Tri-X Panatomic). Lamele trebuie examinate şi fotografiate în 24 de ore de la preparare, deoarece după aceea fluorescenţa cromozomilor se reduce.

Dintre agenţii alkilanţi fluorescenţi folosiţi de Caspersson în experienţele sale amintim pe cei bifuncţionali, care produc benzi fluorescente (Q) puternice: muştarul de quinacrină dihidrocloridă, muştarul de quinacrină propil-dihidrocloridă, quinacrină dihidrocloridă.

Metoda de bandare Q la speeii de *Lilium* (după Kongsuwan şi Smith, 1977)

— Se pun la germinat bulbi de *Lilium* şi după 2—4 săptămîni se recoltează vîrfurile de rădăcini.

— Se prefixează în soluţie de colchicină 0,02% pentru 5 ore.

— Se fixează în alcool etilic absolut: acid acetic 3 : 1, peste noapte sau mai multe zile.

— După o spălare uşoară în apă, vîrfurile de rădăcini se transferă în acid acetic 45%, pentru aproximativ o oră, pentru înmuierea ţesuturilor.

— Se fac preparate squash şi se desprind lamelele de lame prin tehnica gheţii uscate. Lamele se trec prin alcool etilic 95% şi absolut.

— Fără a fi uscate la aer, preparatele se introduc în quinacrină dihidroclorid 0,5% dizolvată în alcool absolut şi se lasă 20 minute.

— După o clătire scurtă în alcool etilic şi uscare la aer, preparatele se montează imediat în apă distilată şi se examinează la microscopul cu fluorescenţă.

Metoda de bandare Q şi C cu cromomicină A_3 şi Giemsa (după Schweitzer, 1977)

S-a observat că unele antibiotice (cromomicina A_3, olivomicina) produc benzi fluorescente pe cromozomii umani (Schweitzer, 1976).

La plante, heterocromatina bogată în guanină — citozină de la *Scilla sibirica* manifestă o fluorescenţă intensă în urma tratamentului cu cromomicină A_3, în timp ce heterocromatina bogată în adenină — timină de la *Ornithogalum caudatum* are o fluorescenţă slabă. Benzile cu o fluorescenţă intensă corespund cu benzile C colorate cu Giemsa.

Tehnica de lucru:

— Din materialul fixat se fac preparate squash în acid acetic 45% şi lamelele se desprind prin metoda gheţii uscate.

— Lamele se clătesc în tampon fosfat Sörensen 1/15 M (pH 6,8) şi se precolorează, 15—30 minute, în 0,5 mg/ml cromomicină A_3 dizolvată în acelaşi tampon. Incubarea se face într-un amestec preparat proaspăt de 0,5 sau 1 mg/ml dezoxiribonuclează pancreatică şi 0,5 mg/ml cromomicină A_3 dizolvată în tampon fosfat conţinînd 5 mM $MgCl_2$ (pH 6,8), la 37°C, timp de 1/2—6 ore. Amestecul cromomicină — DNA-ază se pune pe lamă sub formă de picătură şi se acoperă cu o lamelă. Lama se plasează într-un vas Petri tapetat cu hîrtie de filtru umedă, pentru a împiedica uscarea. Dacă acest tratament de digestie durează cîteva ore, atunci amestecul se completează odată sau de două ori; durata tratamentului se află prin tatonări.

— Lamele se clătesc rapid în apă distilată, se montează în apă distilată şi se examinează imediat la microscopul cu fluorescenţă.

Deoarece fluorescenţa slăbeşte repede şi preparatele nu pot fi făcute permanente, peste colorarea cu fluorocromi se poate aplica colorarea cu Giemsa. Se procedează astfel:

— Lamele clătite cu apă distilată se introduc în soluţie Giemsa 2—3% în tampon fosfat, pH 6,8, timp de 1/2—4 ore.

— Se clătesc în apă distilată, se usucă la aer şi se montează.

S-a constatat că la plante modelul de bandare Q produs de cromomicină sau de diferiţi fluorocromi corespunde, în general, cu modelul de bandare C.

2.4.2. Metode de bandare C (benzi C)

Se presupune că benzile C sînt rezultatul denaturării şi renaturării diferenţiate a ADN prin diferite tratamente. La plante, metodele de colorare diferenţiată cu Giemsa au fost folosite pentru prima dată de Vosa şi Marchi (1972).

Prin metoda de bandare C modificată (după Schwarzacher, Ambros și Schweitzer, 1980) se obțin modele de bandare C distincte în cromozomi și, de asemenea, se poate evidenția heterocromatina asociată cu organizatorul nucleolar, ca și heterocromatina centromerică.

Materiale și soluții:

— Rădăcini proaspăt fixate sau păstrate la frigider un anumit timp.
— Colchicină, α-bromnaftalen sau 8-hidroxiquinoleină.
— Alcool etilic absolut: acid acetic glacial (3 : 1) sau alt fixator.
— Celulază și pectinază (din *Aspergillus niger*).
— Hidroxid de bariu, $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$, 6,3 g dizolvat în apă distilată la 80—90°C.
— Colorant Giemsa.
— Tampon acid citric — citrat de sodiu, pH 4,8, care constă din acid citric monohidrat 0,1 M și citrat trisodic dihidrat 0,1 M. Se amestecă 40 ml acid citric 0,1 M și 60 ml citrat trisodic 0,1 M și apoi se diluează de 10 ori.
— 10 × SSC care constă din NaCl 1,5 M și citrat trisodic dihidrat 0,15 M.
— 2 × SSC: se diluează soluția stoc 10 × SSC de 5 ori.
— Tampon fosfat (Sörensen) pH 6,8 care constă din KH_2PO_4 M/15 și Na_2HPO_4 M/15, care se amestecă în volume egale; aceste soluții se păstrează la frigider și se adaugă cîteva picături de cloroform, pentru a preveni contaminarea microbiană.

Tehnica de lucru:

— Prefixarea rădăcinilor.
— Fixarea, de obicei în alcool etilic — acid acetic glacial 3 : 1, peste noapte sau mai multe zile.
— Spălarea țesuturilor fixate 5—10 minute cu tampon citrat de sodiu 0,01 M, pH 4,8.
— Macerarea și înmuierea țesuturilor în pectinază 1% + celulază 1%, dizolvate în același tampon citrat de sodiu 0,01 M, la 37°C, pentru 1/4—1 1/2 ore. Tratamentul enzimatic nu trebuie să fie prea lung deoarece pot rezulta metafaze incomplete și cromozomi fragmentați.
— Îndepărtarea soluției enzimatice cu grijă și spălarea țesutului în cîteva băi cu tampon citrat de sodiu timp de 1/4 ore pînă la o jumătate de zi.
— Înlocuirea tamponului cu acid acetic 45% și păstrarea, la temperatura camerei sau la frigider, 10 minute pînă la cîteva ore înainte de efectuarea preparatelor.
— Efectuarea de preparate squash în maniera obișnuită, îndepărtarea lamelei prin metoda gheții uscate. Lamele astfel pregătite pot fi păstrate cîteva zile sau săptămîni.
— Lamele se tratează cu acid acetic 45% la 58—60°C pentru 10—20 minute.
— Se spală 15—30 minute în apă de robinet sau apă distilată.
— Se tratează din nou cu soluție saturată de hidroxid de bariu la temperatura camerei, pentru 5—15 minute.

— Se spală 15—30 minute în apă de robinet sau apă distilată.
— Se incubează în 2 × SSC la 60—65°C pentru 1—2 ore.
— Se spală în apă de robinet și apoi se clătesc în două băi de apă distilată.
— Colorarea se face în Giemsa 3—4% diluată în tampon fosfat Sörensen, pH 6,8, pentru 5—60 minute sau mai mult, pînă la apariția benzilor C distincte.
— Lamele se clătesc scurt în apă distilată, se usucă la aer și se montează în euparal.

Varianta 1

— Se pot trata rădăcinile în întregime cu acid acetic 45% la 58—60°C, pentru 10—15 minute.
— Se înlocuiește acidul acetic cu apă distilată rece.
— Se fac preparate squash în maniera obișnuită.
— Se tratează lamele cu hidroxid de bariu la temperatura camerei și se continuă operațiile la fel ca în tehnica originală.

Varianta 2

— Lamele se pregătesc după metoda descrisă, inclusiv tratamentul cu 2 × SSC.
— Pe material se pun cîteva picături de reactiv Schiff, pentru 30 minute, la temperatura camerei.
— Se spală cu apă de robinet, apoi cu apă distilată 30 minute. Se montează în euparal, eukitt sau balsam de Canada.

Timpul exact de tratament cu enzime, cu acid acetic 45%, cu hidroxid de bariu, cu 2 × SSC și timpul de colorare se află prin încercări preliminare pentru fiecare specie și de obicei se încadrează în limitele date în metodă.

Metoda de bandare cu Giemsa la *Vicia faba* (după Döbel, Rieger și Michaelis, 1973)

— Se folosesc meristeme de rădăcini primare, care se pretratează cu colchicină 0,05%, timp de 2 ore.
— Apoi se fixează în alcool etilic absolut : acid acetic glacial (3 : 1).
— Se hidrolizează 5 minute în HCl 0,2 N, la 60°C.
— După efectuarea preparatelor squash în acid acetic 45%, lamelele sînt îndepărtate prin tehnica gheții uscate, iar lamele sînt uscate la aer (pot fi păstrate de la cîteva ore pînă la cîteva săptămîni).
— Lamele sînt tratate la temperatura camerei cu uree 6M, 30 minute.
— După ce lamele sînt imersionate 5 minute în fosfat tampon Sörensen M/15 (pH 7,2) sînt, colorate cu soluție Giemsa 2—4% (pH 6,8), 8—12 minute, spălate în apă distilată, uscate și montate în eukitt sau euparal.

Metoda de bandare C cu orceină acetică (după Canio Vosa, 1973)

Înlocuirea colorantului Giemsa cu orceină acetică a dat rezultate foarte bune, cel puțin la unele specii (ex. *Scilla sibirica*).

— Vîrfurile de rădăcini se pretratează cu o soluție de colchicină (concentrația depinde de specie).

— Se fixează în alcool etilic — acid acetic 3 : 1, peste noapte sau cel puțin 5 ore.

— Se hidrolizează în HCl 1N la 60°C, 25—30 secunde.

— Se spală insistent materialul cu apă distilată.

— Se fac preparate squash în acid acetic 45 % și se desprind lamelele prin tehnica gheții uscate sau în alcool absolut.

— Lamele se usucă la aer și pot fi păstrate o zi sau mai multe zile.

— Se imersionează într-o soluție saturată de hidroxid de bariu, 5—6 minute, la temperatura camerei.

— Apoi se spală și se incubează în 2 × SSC, la 60°C, timp de o oră.

— Lamele se spală din nou, se usucă la aer și se colorează 3—10 minute în soluție standard de 1,5 % orceină acetică. Există tendința de supracolorare rapidă.

2.4.3. Bandarea cu Giemsa a cromozomilor meiotici (după Marks, 1974)

— Muguri florali *(Anemone blanda)* se fixează în fixatorul Pienaar (6 : 3 : 2, alcool metilic : cloroform : acid propionic), se transferă în alcool etilic 90 % în care se și păstrează o săptămînă, la +4°C.

— Se fac preparate squash din 3—4 antere pe fiecare lamă într-o picătură de acid acetic 45 %. După o presare ușoară a anterelor între lamă și lamelă, lamele sînt încălzite foarte puțin. Îndepărtarea lamelelor se face prin tehnica gheții uscate, iar lamele sînt uscate pe o placă fierbinte.

— Urmează o tratare timp de 20 minute cu acid acetic 45 %, la 60°C, spălare 15 minute în apă de robinet și clătire în apă distilată.

— Apoi lamele sînt plasate într-o soluție saturată, proaspătă, de hidroxid de bariu, timp de 5 minute, la temperatura camerei, și spălate o oră în apă de robinet.

— După renaturare în 2 × SSC, la 60°C, timp de o oră, urmează clătirea în apă distilată.

— Colorarea se face în soluție Giemsa 2 % pregătită în tampon fosfat Sörensen, pH 6,9 ; colorarea optimă s-a obținut după aproape o oră.

— După o clătire rapidă în apă distilată preparatele se usucă la aer și se montează în euparal. Cu această tehnică autorii au obținut modele de bandare în pachiten, diploten, metafaza I și anafaza II.

2.4.4. Metode de evidențiere a centromerilor

În timpul metafazei mitotice sau meiotice regiunea centromerică a cromozomilor apare ca o constricție negativ heteropicnotică, despiralizată, numită și constricție primară. De obicei, în preparatele cromozomice această regiune apare necolorată sau foarte slab colorată. Cu ajutorul unor procedee speciale de colorare diferențiată Giemsa, proprietățile de

colorare ale cromozomilor pot fi în așa fel schimbate încît centromerul să apară intens colorat, iar restul cromozomului slab colorat. Se presupune că în procesul colorării diferențiate sînt implicate anumite proteine asociate cu centromerii.

Colorarea Giemsa a centromerilor în mitoză (după Marks, 1977)

— Vîrfurile de rădăcini proaspete sau pretratate cu o soluție de colchicină (0,05 %), 4 ore la temperatura camerei, se fixează peste noapte în alcool etilic absolut : acid acetic (3 : 1).

— Rădăcinile se transferă apoi în acid acetic glacial 45 %, la 60°C, pentru 20 minute, după care sînt trecute în apă distilată la temperatura camerei. Tratamentul cu acid acetic are rolul de a înmuia țesuturile pentru a face posibilă efectuarea de preparate squash.

— Preparatele squash sînt efectuate într-o picătură de acid acetic 45 %, iar lamelele îndepărtate prin metoda gheții uscate și uscate la aer cald.

— Lamele sînt imersionate într-o soluție saturată de hidroxid de bariu, la temperatura camerei, pentru 5—10 minute, apoi clătite în apă distilată și spălate în apă de robinet, timp de o oră.

— Se incubează în 2 × SSC, la 60°C, pentru o oră.

— După spălare în apă distilată, lamele se pun în soluție Giemsa (2 %) pregătită în tampon fosfat M/15, la pH 6,9. Timpul de colorare poate varia între 10 minute și o oră.

— Lamele sînt clătite rapid în apă distilată, uscate pe o placă fierbinte și montate în euparal.

Colorarea Giemsa a centromerilor în meioză (după Marks, 1975)

— Anterele se fixează în fixatorul Pienaar, 24 de ore, și se păstrează o săptămînă în 90 % alcool metilic, la 4°C. Păstrarea în alcool împiedică dezintegrarea celulelor-mamă polinice în timpul efectuării preparatelor.

— Preparatele squash se fac într-o picătură de acid acetic 45 % și sînt observate în contrast de fază. Lamele bune sînt păstrate și, după îndepărtarea lamelelor, se usucă pe o placă încălzită.

— Incubarea lamelor se face în acid acetic 45 %, la 60°C, 20 minute, se spală 15 minute în apă de robinet și se clătesc cu apă distilată.

— Apoi sînt imersionate în soluție saturată proaspătă de hidroxid de bariu sau sodiu la temperatura camerei, pentru 5—10 minute, se clătesc în apă distilată și se spală în apă de robinet o oră.

— Lamele sînt incubate din nou în 2 × SSC, la 60°C, pentru o oră, clătite în apă distilată.

— Se colorează în Giemsa 2 % (diluată în tampon fosfat Sörensen M/15, la pH 6,9). Timpul de colorare se tatonează de la 10 minute la o oră.

— După o spălare rapidă în apă distilată și uscare la aer, preparatele pot fi făcute permanente.

2.4.5. Metoda de evidenţiere a kinetocorilor în meioză (benzi Cd)

Iniţial, termenul de kinetocor era folosit în sens larg, pentru întreaga constricţie primară. Astăzi, *kinetocorii* sînt definiţi ca structuri sau *componente esenţiale ale centromerilor*, care se asociază cu microtubulii fusului nuclear pentru migrarea cromozomilor la polii celulei. Se poate spune că un cromozom metafazic posedă un centromer şi doi kinetocori, iar un cromozom anafazic posedă un kinetocor. După colorare, cei doi kinetocori ai unui cromozom metafazic au aspectul a două puncte, localizate în mijlocul regiunii centromerice, cîte unul pe fiecare cromatidă. Termenul a fost împrumutat din microscopia electronică.

Colorarea kinetocorilor în meioză la *Rhoeo discolor* şi *Allium cepa* (după Stack, 1975)

— Anterele sînt puse pe lamă într-o picătură de acid acetic 45 %. Anterele de *R. discolor* nu trebuie să rămînă în acid acetic mai mult de 5 minute, în timp ce anterele de *A. cepa* pot fi chiar fixate în alcool etilic absolut : acid acetic (3 : 1).

— Preparatele squash se fac cu grijă, îndepărtîndu-se peretele anterelor, iar celulele trebuie să se găsească într-un singur plan. Lamelele se îndepărtează prin metoda gheţii uscate şi uscarea lamelor are loc la temperatura camerei, fără a fi lăsate mai mult de o oră înainte de următorul tratament (tabelul nr. 13).

Tratarea lamelor cu tampon fosfat rece (de la gheaţă) îmbunătăţeşte colorarea la *A. cepa*.

Tabelul nr. 13

. Tratamente pentru evidenţierea kinetocorilor în meioză

Rhoeo discolor	*Allium cepa*
lame uscate la aer	lame uscate la aer
5 minute, în 2 × SSC (pH 7,0), la 90 °C	10 minute, în tampon fosfat 0,2 M (pH 6,8), la 90—94 °C
1 oră, în 2 × SSC, la 60 °C	15 s în tampon fosfat rece (la gheaţă)
	1—2 ore, în tampon fosfat, la 60°
	15 s în tampon fosfat rece
Colorare Giemsa (1/10 tampon fosfat)	Colorare Giemsa (1/10 tampon fosfat)

2.4.6. Metoda de bandare N (benzi N)

Benzile N reprezintă heterocromatina constitutivă asociată cu organizatorul nucleolar. Principiul care stă la baza evidenţierii acestor benzi este cel al extragerii macromoleculelor de ADN şi proteinelor histonice cu ajutorul unui tratament acid, rămînînd numai proteinele non-histonice structurale, legate specific de cistronii ribozomali şi care se colorează selectiv. Nu se ştie exact care este rolul acestor proteine non-histonice reziduale în funcţia nucleolului.

Metoda de bandare N la *Vicia faba* (după Matsui, 1974)

— Rădăcinile primare în vîrstă de 3—4 zile, prefixate în colchicina (0,05 %), sînt fixate în alcool etilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1) pentru două ore.

— Preparatele squash se fac în acid acetic 45 %, iar lamelele se îndepărtează prin tehnica gheţii uscate.

— Lamele astfel pregătite sînt incubate în 5 % acid tricloracetic (90°C, 15 minute) şi apoi în HCl 0,1N (60°C, 15 minute).

— Colorarea se face cu Giemsa (1 : 10) în tampon fosfat 1/15M, la pH 7,2. Spălarea se face cu apă de robinet, iar uscarea la aer.

Modificările aduse metodei (Funaki şi Matsui, 1975) constau în următoarele : lamele sînt incubate la 96° ± 1°C pentru 15 minute în soluţie de 1 M NaH_2PO_4 (pH 4,2 ± 0,2 ajustat cu NaOH 1 N). După spălare intensă în apă distilată, lamele sînt colorate în soluţie Giemsa (1 : 25 în tampon fosfat 1/15 M, la pH 7,0). Urmează spălarea în apă de robinet, uscarea la aer şi montarea în euparal.

2.4.7. Metoda de bandare T (benzi T) (după Stack şi Clarke, 1973)

Această tehnică se foloseşte pentru punerea în evidenţă a heterocromatinei telomerice. Cel puţin la *Allium cepa*, telomerele constau din heterocromatină constitutivă şi, foarte probabil, o parte din ADN repetitiv existent la această specie. Aceasta implică discutarea rolului telomerelor în împerecherea cromozomilor meiotici şi în constituirea de asociaţii omologe şi neomologe cap-la-cap între cromozomii mitotici.

Tehnica de lucru :

— Rădăcinile obţinute prin germinarea bulbilor de ceapă sînt împărţite în două părţi : o parte se tratează cu colchicină (0,2 %), 6 ore, la temperatura camerei, la întuneric, iar cealaltă parte nu se tratează cu colchicină.

— Ambele loturi sînt excizate şi fixate ori în alcool etilic absolut : acid acetic (3 : 1), pentru o oră, la temperatura camerei, ori plasate în acid acetic 45 %, pentru 10 minute.

— Preparatele squash se fac într-o picătură de acid acetic 45 %, iar lamelele se îndepărtează prin metoda gheţii uscate ; lamele sînt lăsate să se usuce la aer. Lamele uscate se tratează cu o soluţie saturată de hidroxid de bariu, la 22°C, pentru 10 minute şi se spală 5 minute în apă distilată.

— Urmează incubarea la 60°C, timp de o oră în tampon fosfat de potasiu 0,12 M, la pH 6,8.

— Imediat lamele se colorează la temperatura camerei 10—30 minute în soluţie Giemsa (1 parte Giemsa/9 părţi tampon fosfat de potasiu, pH 6,8). Lamele se clătesc în apă distilată, se usucă la aer şi se montează în euparal.

2.4.8. Evidențierea heterocromatinei centromerice și telomerice cu ajutorul extensilinei (după Raicu, Pătrașcu, Chirilă și Gorenflot, 1975)

Autorii au observat că extensilina (benzatină-penicilină), un derivat al penicilinei G, acționează într-un mod deosebit asupra cromozomilor la plante, producînd benzi în regiunile centromerice și telomerice. Această tehnică de bandare s-a dovedit simplă și rapidă, bazîndu-se pe însăși efectul antibioticului pe cromozomi. Speciile pe care s-a lucrat sînt: *Allium cepa*, *Secale cereale* și *Nicotiana alata*.

— Vîrfurile de rădăcini (2 cm lungime) se plasează într-o emulsie de α-clornaftalenă, preparată cu o soluție de extensilină (30 000—48 000 U.I./ml apă distilată), timp de 90 minute. Fixarea se realizează în alcool acetic 3 : 1, iar hidroliza cu HCl 1 N, 10—15 minute, la 60°C. Preparatele de tip squash se colorează Feulgen și se montează în euparal.

Modelele de benzi obținute sînt comparabile cu modelele obținute prin alte tehnici de bandare.

2.4.9. Metoda de colorare diferențiată după tratamentul cu acid clorhidric (benzi Hy) (după Greilhüber, 1973)

Heterogenitatea heterocromatinei la plante s-a observat prin compararea modelelor de bandare C cu modelele de bandare Hy („hydrochloric acid"). Astfel, prin bandare C este evidențiată în general heterocromatina constitutivă totală, iar prin bandare Hy, de ex. la *Vicia faba*, numai heterocromatina asociată cu organizatorul nucleolar, deci de pe cromozomul M, benzi Hy+, heterocromatina centromerică fiind slab colorată, benzi Hy—; heterocromatina cromozomilor S nu este deloc colorată, benzi Hy0.

Pentru obținerea benzilor Hy se procedează astfel:

— Se fixează țesuturile în alcool etilic : acid acetic (3 : 1) pentru 15 minute — 24 de ore, dar nu mai mult.

— Se clătesc în apă distilată, 5 minute.

— Se hidrolizează cu HCl 0,2 N, la 60°C, pentru 30 minute, sau la 70°C, pentru 10 minute, sau la 80°C, pentru 5 minute.

— Se transferă în apă de robinet rece.

— Se colorează în carmin acetic rece, cîteva minute sau cîteva ore, fără tendință de supracolorare.

— Se fac preparate squash.

Modificări aduse metodei standard:

— Înainte de fixare, meristemele sînt pretratate cu acid acetic 45 % sau NaOH 0,007 M pentru 5 minute.

— Hidroliza poate fi făcută în HCl 0,1 N; HCl 0,2 N la 60°C sau 80°C.

— Colorarea poate fi făcută și cu reactivul Schiff.

— Lamelele se desprind prin tehnica gheții uscate, se clătesc în alcool etilic și se montează.

2.5. Evidențierea structurii spiralizate a cromozomilor

Cromozomii au un aspect spiralizat, care se pare că este o caracteristică generală la eucariote și una din modalitățile de supraîmpachetare a fibrei cromatidice elementare, vizibilă la microscopul optic. Dar acest aspect nu poate fi observat decît prin tratamente speciale, din cauza procesului normal de condensare a cromatinei.

Structura spiralizată a cromozomilor la Trillium a fost pusă în evidență în celulele-mamă polinice (Matsuura, 1962). Tehnica constă dintr-un pretratament al materialului cu un amestec (4 : 2 : 1) din soluții echimolare (0,33 M) de KCl, $NaNO_3$ și CH_3COONa, timp de 2—3 minute, la temperatura camerei. După tratament, materialul se spală în apă distilată, se fixează în alcool etilic absolut : acid acetic (3 : 1) și se colorează Feulgen.

Cu ajutorul acestei tehnici pot fi stabilite: numărul de giri (răsuciri), care probabil este constant pentru un anume cromozom, direcția întîmplătoare a răsucirii, lipsa de răsucire sau o răsucire mai puțin strînsă a unităților fibrilare în regiunea centromerului și a constricțiilor secundare (Ohnuki, 1969). De asemenea, analiza rupturilor cromozomice și a translocațiilor induse cu substanțe chimice sau radiații ionizante poate fi făcută cu mai multă acuratețe pe cromozomi metafazici puțin despiralizați decît pe cei foarte contractați.

2.6. Metoda de izolare a cromozomilor metafazici (după Trosko și Wolff, 1965; Stoian, Raicu și Gorenflot, 1974)

Organizarea moleculară a cromozomului și natura chimică a diferitelor sale componente pot fi studiate cu mai multă acuratețe pe cromozomi metafazici izolați de citoplasmă (liberi de citoplasmă). Mirsky și Ris (1951) au folosit prima dată astfel de metode pentru celulele animale.

Pe preparatele cu cromozomi relativ liberi de citoplasmă (direct pe lamă sau în eprubetă, în suspensia de cromozomi) pot fi aplicate diferite tratamente cu enzime (tripsină, pepsină, ribonuclează, dezoxiribonuclează) sau cu diferiți agenți chimici. În funcție de tratamentul făcut, cromozomii apar contractați sau despiralizați, dezintegrați sau își păstrează forma caracteristică. De asemenea, izolarea lor se face și pentru vizualizarea la microscopul electronic sau pentru caracterizarea morfologică și a naturii chimice a unor aberații cromozomiale, cum sînt, de exemplu, leziunile acromatice (Stoian și Raicu, 1975).

Metoda constă în următoarele: pentru acumularea unui număr mare de diviziuni, respectiv de metafaze, se folosesc mai întîi metoda de sincronizare a diviziunii celulare cu ajutorul 5-aminouracilului (vezi cap. 1) și metoda de acumulare de metafaze cu ajutorul colchicinei.

Tehnica de lucru:

— Plăntuţele sînt puse într-o soluţie de 5-aminouracil (0,75 g/l), 24 de ore.

— Se spală în apă de robinet, 15 minute, şi se lasă pentru refacere în apă aerată 8—10 ore; după acest timp, indicele mitotic este de aproximativ 40 %.

— Apoi plăntuţele sînt transferate într-o soluţie de colchicină 0,01 %, timp de 5—6 ore; indicele mitotic ajunge la aproximativ 70 %.

— Vîrfurile meristematice se spală şi se fixează în soluţie de formalină 5 % în tampon fosfat neutru 0,006 M, pentru o oră, la 2°C.

— Se taie numai porţiunea meristematică, se omogenizează într-un mojar şi se filtrează printr-o ţesătură de nylon cu reţeaua de 25 μm.

— La omogenat se mai adaugă fixator şi se centrifughează la 1 000 rpm, pentru 5 minute; se fac 3—4 centrifugări.

— Sedimentul cu cromozomi şi nuclei liberi de citoplasmă este resuspendat în tampon fosfat în vederea tratamentului cu enzime sau diferite substanţe mutagene.

— Se pune pe lamă o picătură de tampon conţinînd cromozomi izolaţi, la care se adaugă 2—3 picături din soluţia de tratament; se amestecă.

— Lamele sînt plasate într-un vas Petri tapetat cu hîrtie de filtru umedă şi incubate la 37°C pentru 30 minute.

— Apoi sînt uscate la aer şi colorate prin metoda Feulgen pentru evidenţierea ADN, cu azur B pentru evidenţierea ARN sau cu albastru de bromfenol alcalin pentru histone.

— Tratamentul cu enzime sau mutageni se poate face şi în eprubetă, după care se fac frotiuri, se usucă şi se colorează similar.

3 Metode pentru studiul cromozomilor la animale

Deşi cromozomii au fost descoperiţi cu aproximativ 100 de ani în urmă, elaborarea unor metode eficiente pentru studiul lor este tardivă. La om, de exemplu, numărul real de cromozomi $2n = 46$ a fost stabilit de către Tjio şi Levan (1956) şi, independent de ei, de Ford şi Hamerton (1956), prin lucrări ce marchează începuturile citogeneticii umane moderne. În perioada anilor '60 s-au elaborat primele metode eficiente de studiu al materialului genetic la animale, care permit evidenţierea cromozomilor foarte bine etalaţi, într-un timp relativ scurt, folosind tratamente preliminare cu colchicină (sau alte substanţe statmocinetice) şi cu soluţii hipotone. Prin folosirea culturilor de celule şi ţesuturi, citogeneticienii au trecut la elaborarea de noi metode pentru prepararea cromozomilor. Astfel, Caspersson şi colab. (1969) au pus la punct prima tehnică de bandare a cromozomilor. Ulterior, pornind de la această tehnică, s-au pus la punct o serie de metode de bandare cu ajutorul cărora se identifică cu precizie perechile de cromozomi şi se fac progrese în elaborarea cariotipului uman şi al diverselor specii de animale şi în identificarea diverselor tipuri de restructurări cromozomiale etc.

Înainte de a prezenta diferitele metode de evidenţiere a cromozomilor la animale, considerăm utilă o descriere succintă a principalelor etape întîlnite în aceste metode. Astfel, toate metodele moderne de preparare a cromozomilor comportă următoarele faze: colchicinizarea, hipotonia, fixarea, etalarea cromozomilor pe lamă şi colorarea.

Pretratamentul cu un inhibitor mitotic (colchicinizarea) realizează acumularea în ţesuturi a unui număr sporit de mitoze blocate în metafază. De obicei, pretratamentul se realizează cu colchicină, alcaloid cu proprietăţi statmocinetice, a cărei acţiune constă în inhibarea fusului de diviziune. Cantitatea şi concentraţia soluţiei de colchicină administrată variază de la specie la specie; în concentraţii mari, efectul ei poate fi defavorabil în studiul cariotipului, prin contractarea extremă a cromozomilor. În tehnicile citologice curente se folosesc şi alţi inhibitori mitotici de tip colcemid (diacetilmetil-colchicină) şi velban (sulfat de vinblastină). Colcemidul este mai puţin toxic decît colchicina şi este preferat în studiile *in vitro*. Concentraţia soluţiilor de colcemid şi velban este mai scăzută decît a celei de colchicină, pentru aceeaşi durată a tratamentului.

Tratamentul cu soluții hipotone (hipotonia) determină o umflare și o fluidizare a citoplasmei, permițînd dispersia cromozomilor și, în consecință, o etalare superioară a lor. În general, soluția hipotonă trebuie să reprezinte 1/4 din concentrația unei soluții saline fiziologice. În tehnicile curente se folosesc ca soluții hipotone : soluția de citrat de sodiu 0,6—1,2 %, clorura de potasiu 0,56 % (0,075 M), soluția Hanks în diluție 1 : 3, mediul de cultură diluat cu apă distilată sau pur și simplu apă distilată. În cazul prelucrării materialului biologic provenit de la mamifere se recomandă ca soluția hipotonă să fie păstrată la termostat la 37°C, iar suspensia celulară să fie menținută la această temperatură tot timpul tratamentului.

Timpul de hipotonie variază între 10 și 60 minute în funcție de specie, consistența țesutului și temperatura la care se realizează tratamentul. De obicei, timpul se stabilește prin tatonări pentru fiecare specie și în funcție de soluția folosită. Un timp de hipotonie mai scăzut sau o concentrație prea mare a soluției hipotone reduc umflarea celulelor și răspîndirea cromozomilor. Un timp mai mare sau folosirea unor soluții de concentrații mai scăzute pot produce o etalare superioară a cromozomilor, dar aceștia au un aspect flaușat (scămos) și se colorează foarte greu.

Fixarea se face cu scopul de a omorî celulele fără să se altereze componentele celulare. Fixatorul cel mai folosit în citogenetică este mixtura de metanol (sau etanol) și acid acetic glacial în concentrație de 3 : 1. În general, celulele se fixează după 5—10 minute. Menținerea celulelor în fixator nu trebuie să depășească 30 minute, timp după care mixtura formează acetat de metil, fixator de proastă calitate, care scade mult calitatea cromozomilor. În cazul în care tehnicile de preparare a cromozomilor cer menținerea celulelor în fixator o perioadă mai lungă de timp, celulele fixate se păstrează la frigider, iar fixatorul se schimbă cu fixator proaspăt după 24 de ore.

Colorarea se efectuează în scopul obținerii contrastului necesar examinării microscopice a cromozomilor. De obicei, colorarea se face înaintea efectuării preparatelor de tip squash sau după efectuarea frotiurilor uscate la aer. Dintre numeroșii coloranți nucleari, cel mai frecvent folosiți în citogenetică sînt : carminul acetic, orceina acetică, soluția Giemsa și reactivul Schiff.

Etalarea sau dispersia cromozomilor în celulă se realizează în timpul efectuării preparatelor pe lame în scopul vizualizării la microscop prin două tehnici : tehnica squash și tehnica frotiurilor uscate la aer sau la flacără.

a. *Tehnica squash*. Fragmentele de țesut se scot din colorant și se pun la mijlocul unei lame (bine spălată și degresată) într-o picătură de acid acetic 45 % (cînd materialul este bine colorat) sau orceină acetică (cînd materialul n-a fost colorat suficient). Peste fragmente se așază o lamelă cu o peliculă fină de glicerină albuminată. În scopul eliminării surplusului de acid acetic sau de colorant, peste lamelă se pune o bucată de hîrtie de filtru și cu degetul mare se presează uniform și destul de puternic (în cazul țesuturilor moi, această operație este suficientă pentru a realiza o bună etalare a celulelor și a cromozomilor).

Tehnica are avantajul de a fi foarte rapidă, mai ales în cazul în care se folosește orceina acetică care realizează simultan fixarea și colorarea.

Inconvenientul major constă în faptul că, în timpul executării preparatului, un număr de celule se sparg, mărind gradul de dificultate în stabilirea numărului diploid, iar cromozomii se pot dispune în mai multe planuri creînd probleme la microfotografiere.

b. *Tehnica frotiurilor uscate la aer sau la flacără* este mai nouă și stă la baza tuturor metodelor de evidențiere a cromozomilor prin care se prelucrează materialul biologic pînă la stadiul de suspensie celulară în fixator.

Pe lame perfect degresate, păstrate într-un recipient cu apă distilată și cuburi de gheață, se picură cu o pipetă Pasteur o cantitate mică de suspensie celulară. După ce suspensia s-a răspîndit uniform pe întreaga suprafață a lamei (prin mișcări de balansare) se lasă să se usuce la temperatura camerei timp de 10—12 minute. Frotiurile uscate se spală în apă de robinet în vase Laveran, 20—30 minute, și se clătesc în două schimburi de apă distilată, în scopul înlăturării urmelor de fixator, care ar împiedica realizarea unei colorații de bună calitate. Ulterior, frotiurile se colorează cu soluție Giemsa sau cu alt colorant.

Materialul biologic folosit. Deoarece cromozomii reprezintă materialul nuclear organizat pentru diviziune, studiul lor se poate realiza direct în țesuturi cu activitate mitotică intensă : țesutul hematopoetic, hepatic, splenic, gonadal, epiteliul cornean, țesuturi embrionare sau de regenerare sau indirect, în culturi de celule și țesuturi.

Avînd în vedere numărul mare de metode elaborate pentru studiul cromozomilor la vertebrate, considerăm utilă o grupare a lor pe grupe sistematice.

3.1. Metode pentru studiul cromozomilor în mitoză

3.1.1. Metode pentru studiul cromozomilor la pești

La pești se folosesc cu rezultate bune țesutul epitelial (epiteliul înnotătoarelor, al solzilor, branhial, cornean și conjunctival), splina, rinichiul, ficatul și testiculele. În culturi, rezultate foarte bune au dat și țesutul ovarian, vezica înnotătoare, inima și sîngele integral sau leucocite în culturi pe termen scurt. Deoarece embriogeneza este acompaniată de o intensă activitate mitotică s-au pus la punct o serie de metode pentru studiul cromozomilor în ouă embrionate.

Studiul cromozomilor în ouă embrionate

Tehnica de lucru după Simon (1964) :

— Se utilizează ouă fecundate de *Salmo gairdneri*, incubate 48 de ore, la 50°F.

— Ouăle se transferă într-un vas și se acoperă cu fixator Carnoy sau alcool etilic absolut : acid acetic (3 : 1). Se păstrează la frigider 24 de ore.

— Se separă şi se extrage blastodiscul cu ajutorul unei foarfece curbe.

— Se transferă circa 12 blastodiscuri într-un vas care conţine 3—5 ml acetonă, în scopul de a extrage resturile de substanţe viteline. După 5 minute se decantează acetona.

— Se fac două spălări rapide în fixator Carnoy sau alcool etilic absolut : acid acetic (3 : 1).

— Se colorează cu orceină acetică (2 %), care conţine 1 volum acid propionic la 19 volume colorant, timp de 10—15 minute.

— După colorare, se transferă 3—4 blastodiscuri pe o lamă bine degresată şi se efectuează preparate squash.

Pentru acest studiu pot fi folosite şi ouă în stadiu de morulă.

— Morulele se hipotonizează într-o soluţie de NaCl (0,8 %). Se înţeapă cu un ac sau se taie uşor şi se spală de cîteva ori în soluţie de NaCl (0,8 %) pentru îndepărtarea vitelusului.

— Se fixează şi se colorează concomitent în orceină acetică (2 %), timp de 30 minute.

— Se efectuează preparate squash.

Tehnica de lucru după Rees (1967) :

— Se folosesc ouă fecundate după 6—8 săptămîni de incubaţie.

— Se scot embrionii şi se imersionează într-o soluţie de colchicină (0,2 %), 4 ore.

— Se fixează embrionii în alcool etilic absolut : acid acetic (3 : 1) sau în acid acetic 50 %, 50 minute.

— Se colorează cu carmin acetic (2 %) sau cu orceină propionică (1 %).

— Se efectuează preparate squash din diferite părţi ale embrionului.

Tehnica de lucru după Endo şi Ingalis (1968) :

— Se folosesc ouă fecundate de o zi de la peştele-zebră.

— După prima zi de dezvoltare embrionară, ouăle se introduc într-un vas Petri, care conţine o soluţie salină izotonă.

— Se îndepărtează membranele, iar embrionii se transferă într-o sticlă de ceas, care conţine soluţie izotonă + 0,2 μg/ml de colcemid. Se fragmentează bine în această soluţie, iar suspensia celulară se transferă într-un pahar de laborator (de 10 ml) şi se mai adaugă o cantitate mică de soluţie izotonă cu colcemid.

— Se agită 20 minute pe un agitator magnetic.

— Se centrifughează 5 minute la 600 rpm, se decantează supernatantul şi se adaugă 2—3 ml soluţie hipotonă. Se lasă 20 minute la temperatura camerei şi încă 30 minute la frigider.

— Se centrifughează din nou, se elimină supernatantul şi se adaugă fixator pentru 30 minute.

— Se centrifughează iarăşi, se decantează supernatantul şi se mai fac 2—3 fixări similare.

— Din ultima suspensie de celule în fixator se fac frotiuri după tehnica uscării la aer.

Studiul cromozomilor în diverse ţesuturi

Tehnica de lucru după Ohno (1965) :

— Se injectează peştele în musculatura dorsală cu 0,5—1 ml dintr-o soluţie de colchicină (0,5 %), cu două ore înainte de sacrificare.

— Se recoltează splina, rinichiul şi gonadele şi se fragmentează în bucăţi de aproximativ 2 mm^3.

— Hipotonia se realizează în apă distilată, la pH 7 pentru 15 minute.

— Se fixează în acid acetic 50 %, 15—30 minute, şi se efectuează preparate squash.

— Se îndepărtează lamela prin îngheţare uscată şi se face o hidroliză în HCl 1 N, la 60°C, 10—15 minute.

— Se colorează cu soluţie Giemsa.

Tehnica de lucru după Ojima şi Hitotsumachi (1967) este o variantă a metodei anterioare.

— Cromozomii s-au evidenţiat în celulele renale şi gonadale recoltate de la reprezentanţi ai fam. *Cyprinidae*.

— Fixarea materialului se face într-o mixtură de alcool metilic absolut şi acid acetic glacial 3 : 1.

— Se colorează cu Feulgen sau carmin acetic 2 %.

Tehnica de lucru după Srivastava şi Das (1968) :

— Se evidenţiază cromozomii în celulele renale după o colchinizare de 5—8 ore cu o soluţie de colchicină 0,1 %, în doză de 2 ml/100 g.

— Hipotonia şi fixarea ca în tehnicile anterioare.

— Se fac frotiuri după metoda uscării la aer, care se colorează cu soluţie Giemsa.

Tehnica de lucru după Raicu şi Taiseseu (1972) :

— Animalele se injectează intramuscular cu o soluţie de colchicină 0,5 %, cu două ore înainte de sacrificare.

— După sacrificare se prelevă : splina, ficatul, rinichiul, gonadele şi branhiile ; fiecare organ se fragmentează bine într-o soluţie hipotonă de citrat de sodiu 0,4—0,7 % (în funcţie de specie), în care se ţin 45 minute pe un agitator magnetic, la temperatura camerei.

— Se filtrează printr-un tifon dublu într-o eprubetă de centrifugă, se centrifughează 15 minute la 1 500 rpm şi se decantează supernatantul.

— Sedimentul celular se resuspendă în fixator (alcool etilic absolut : acid acetic glacial, 3 : 1) ; această primă fixare se face picurînd soluţia de fixator pe pereţii eprubetei ; se lasă la frigider 1/2 oră.

— Se centrifughează, se elimină supernatantul şi se repetă de 3—5 ori fixarea ; fiecare fixare este precedată de o centrifugare, iar în intervalul dintre centrifugări, materialul este lăsat cîte 1/2 oră la frigider.

— Din ultima suspensie de celule se fac frotiuri pe lame îngheţate, după tehnica uscării la aer.

— Colorarea se face cu soluţie Giemsa 15 %, 20 minute.

Studiul cromozomilor în culturi de celule şi ţesuturi

La peşti, efectuarea unor culturi celulare rămîne încă o problemă, metodele standardizate avînd o valabilitate redusă din cauza imensei variabilităţi existente în cadrul clasei. Timpul de la iniţierea culturii şi pînă la folosirea ei variază între 24 de ore şi 6 zile, uneori chiar două luni, în funcţie de specie, dimensiunea şi vîrsta exemplarului folosit şi ţesutul din care s-a iniţiat cultura.

Tehnica de lucru după Roberts (1967, 1970):

— Se folosesc culturi primare din testicul, splină, rinichi, vezică înnotătoare, ovar şi ficat.

— Se sacrifică animalul prin secţionarea coardei dorsale, imediat înapoia capului; se clăteşte în apă de robinet şi se tamponează cu alcool 70 %.

— Se recoltează steril 2—4 cm^3 din ţesut (instrumentele se păstrează în alcool 70 % şi se flambează înaintea fiecărei folosiri).

— Se transferă ţesutul într-un vas Petri cu soluţie salină echilibrată Hanks, unde se fragmentează bine şi se spală de trei ori cu aceeaşi soluţie salină rece.

— Se transferă fragmentele într-un alt vas care conţine mediu de digestie proaspăt preparat (17 ml soluţie salină echilibrată Hanks, 2 ml soluţie de tripsină 2,5 %, 1 000—4 000 unităţi penicilină, 1 000—4 000 μg/ml streptomicină şi 0,5 ml ser fetal de viţel).

— Se agită ţesutul în mediul de digestie timp de o oră, la 4°C, pe un agitator magnetic. Se decantează supernatantul şi se adaugă un volum de mediu de digestie proaspăt egal cu cel decantat. Se lasă 1,5—3 ore pentru a se produce digestia şi se transferă supernatantul în tuburi de centrifugă sterile.

— Celulele se sedimentează prin centrifugare la rece, cu o turaţie de 200 rpm, 10 minute; se înlătură supernatantul.

— Se clătesc celulele cu ser de viţel pentru a neutraliza tripsina.

— Se resuspendă sedimentul într-un mediu de creştere care constă din: 800 ml MEM (Eagle), 56 ml ser fetal de viţel, 8 ml glutamină-L, 100 U/ml penicilină, 100 μg/ml streptomicină. Se ajustează pH-ul la 7,2 şi se sterilizează, dacă este necesar. Mediul se păstrează la frigider.

— Se inoculează 1,5 ml de suspensie celulară în tuburi Leighton care conţin lamele. Se astupă cu dopuri de cauciuc şi se incubează la 19 ± 1°C, 5—6 zile.

— Cu 6 zile înainte de recoltare se adaugă 1,5 ml colcemid, apoi se îndepărtează mediul cu colcemid şi se înlocuieşte cu 3 ml soluţie citrat de sodiu (0,9 %), timp de 10 minute. Se îndepărtează şi citratul, şi se colorează cu orceină acetică 1 % timp de 5 minute.

— Lamele se montează în balsam de Canada.

Tehnica de lucru după Chen (1970):

— Se extirpă ovarele steril, se pun într-un vas de cultură care conţine 5 ml viokase (0,25 %) şi se mărunţesc bine.

— Fragmentele sînt supuse unei digestii în 10 ml viokase pe un agitator magnetic, 15 minute, la temperatura camerei.

— Se adaugă 1 ml ser fetal bovin (pentru a opri acţiunea viokaseului); concentraţia poate creşte pînă la 10 %.

— Celulele, după ce se depun, se colectează şi se resuspendă în 1 ml mediu de cultură F-10 sau F-12.

— Se inoculează în flacoane de cultură care conţin 4 ml mediu şi se incubează la 31°C, timp de 5—7 zile.

Cînd în flaconul de cultură s-au acumulat suficiente celule, se adaugă 0,05 ml colcemid (100 μg colcemid dizolvat în 1 ml apă dublu distilată) pentru 8 ore.

— Se îndepărtează mediul şi se adaugă 3 ml soluţie hipotonă cu versen şi tripsină pentru 10 minute.

— Suspensia celulară se colectează într-un tub de centrifugă cu 0,3 ml ser fetal bovin. Se centrifughează la 1 000 rpm, timp de 10 minute. Se îndepărtează supernatantul, oprindu-se 0,5 ml în care se resuspendă celulele.

— Se adaugă 4 ml soluţie hipotonă de KCl (0,075 M), pentru 10 minute, după care se centrifughează încă o dată, 10 minute, la 1 000 rpm. Se decantează supernatantul şi se face fixarea în alcool etilic absolut — acid acetic (3 : 1), timp de 15 minute.

— După o repetare a fixării în fixator proaspăt, din suspensia celulară se fac frotiuri după tehnica uscării la aer.

— Se colorează cu orceină acetică timp de 15 minute.

Evidenţierea cromozomilor în culturi de leucocite. Cu toate că peştii au un număr crescut de leucocite, se ştie foarte puţin despre stimularea diviziunii acestora la poikiloterme. Roberts (1967), precum şi Wolf şi Quimby (1969) nu au obţinut nici un fel de rezultate în stimularea diviziunii leucocitelor la peşti, iar Ojima şi colab. (1967) au obţinut rezultate satisfăcătoare la crap şi caras, folosind fitohemaglutinina comercială. Ulterior s-au pus la punct o serie de tehnici pentru cultivarea leucocitelor în vederea evidenţierii cromozomilor la peşti.

Tehnica de lucru după Labat şi colab. (1967):

— Se recoltează 0,5 ml sînge din inimă cu o seringă heparinizată şi imediat se amestecă cu mediul de cultură care constă din: 6 ml ultrafiltrat de ou, 30 ml hidrolizat de lactalbumină (2 %), 11,8 ml ser fetal de viţel, 6 ml fitohemaglutinină M, 25 000 unităţi de penicilină G şi 5 ml streptomicină.

— Se inoculează în tuburi pyrex, la 20°C, timp de 72 de ore.

— Cu cîteva ore înainte de recoltare se adaugă colchicină.

— După recoltare, suspensia celulară se prelucrează prin hipotonie şi fixare în vederea efectuării preparatelor după tehnica uscării la aer.

Tehnica de lucru după Ojima şi colab. (1967):

— Se recoltează 0,2 ml sînge integral din ventriculul cardiac al unui exemplar tînăr.

— Se suspendă sîngele într-un mediu care conţine: 2 ml ser de viţel şi 0,1 ml fitohemaglutinină M în 8 ml mediu TC-199 cu penicilină şi streptomicină. Se ajustează pH-ul la 7,0—7,2 şi se incubează la 25—30°C timp de 72 de ore.

— A treia zi se adaugă o picătură de colchicină 1×10^{-8} M, pentru 5—6 ore.

— Se centrifughează la 800 rpm, timp de 5—10 minute; se îndepărtează supernatantul şi se adaugă o soluţie hipotonă (o parte soluţie salină Hanks şi 3 părţi apă distilată).

— Se centrifughează din nou 10 minute la 800 rpm, se decantează supernatantul şi se resuspendă celulele în fixator Carnoy. După o oră se repetă fixarea şi din suspensia de celule se efectuează frotiuri după tehnica uscării la aer.

Tehnica de lucru după Heckman şi colab. (1970, 1971):

— Se extrag 4—8 ml sînge din inimă, prin puncţie cardiacă, de la un exemplar mare, cu o seringă de 10 ml care conţine 0,5 ml anticoagulant; se sedimentează eritrocitele prin centrifugare, la 9°C, cu o turaţie de 100 rpm.

— Într-un vas de cultură se pune următorul mediu: 100 ml MEM, 10 ml ser fetal de viţel, 0,2 ml glutamină-L; se saturează cu oxigen pur şi se adaugă 0,4 ml plasmă bogată în leucocite şi 0,3 ml fitohemaglutinină M. Se incubează 120 de ore, la 19°C.

— Cu 4 ore înainte de recoltare se adaugă colchicină în amestec cu soluţie salină echilibrată Hanks pentru a atinge concentraţia finală de 0,005 mg/ml.

— Se recoltează celulele prin centrifugare la 800 rpm, se îndepărtează supernatantul şi se adaugă soluţie hipotonă (0,067 g $CaCl_2$ şi 0,2 g citrat de sodiu în 100 ml apă), pentru 20 minute, la 22°C.

— Se centrifughează din nou, se elimină supernatantul, iar sedimentul celular se resuspendă în fixator (alcool metilic absolut — acid acetic glacial, 3 : 1).

— Se repetă fixarea şi se efectuează preparate după tehnica uscării la aer.

3.1.2. Metode pentru studiul cromozomilor la amfibieni

Tehnica de lucru după Signoret (1965):

— Se imersionează ouă de *Ambystoma mexicanum* în apă de robinet cu temperatura de 18—20°C; la 24—30 de ore de la fecundare se ajunge în stadiul de blastulă.

— Blastulele sînt supuse unui pretratament cu apă la 0°C, timp de 100 de ore, în scopul unei contractări optime şi a unei colorări mai bune a cromozomilor, după care se trec în apă la temperatura camerei şi se elimină membrana vitelină.

— Fiecare blastulă se fragmentează în patru părţi egale şi se hipotonizează în apă bidistilată, timp de 6 minute.

— Fixarea se face 4 minute în soluţie Dyer, care se prepară:

Alcool etilic absolut	10 volume
Acid acetic glacial	2 „
Cloroform	2 „
Formol	2 „

— Colorarea se face timp de 30 minute, în soluţie de orceină lactopropionică cu următoarea compoziţie:

Acid lactic	50 ml
Acid propionic	50 ml
Orceină	1 g

Înainte de utilizare soluţia se diluează astfel: 45 ml soluţie orceină lactopropionică + 55 ml apă distilată.

— Se realizează preparate squash.

Tehnica de lucru după Beçak, Beçak şi Rabelio (1966):

— Se folosesc animale adulte de *Odontophrynus americanus* (broască sudamericană), care se injectează intraperitoneal cu 0,25 ml soluţie colchicină (0,5 %), timp de două ore.

— După colchicinizare, animalele se sacrifică şi se recoltează splina şi gonadele, care se fragmentează în bucăţi de 1—2 mm^3.

— Hipotonia se realizează în apă distilată, 15 minute.

— Fixarea se face în acid acetic 50 %, 15 minute.

— Se efectuează preparate squash. Se desprind lamelele de pe lame prin congelare cu gheaţă carbonică. Materialul se hidrolizează 10 minute, la 60°C, în HCl 1N.

— Colorarea se realizează cu soluţie Giemsa.

3.1.3. Metode pentru evidenţierea cromozomilor la reptile

Evidenţierea cromozomilor in vivo

Tehnica de lucru după Kobel (1962):

— Se colchinizează vipere de la care se prelevă măduva din coloana vertebrală.

— Se efectuează preparate squash în carmin sau orceină acetică 2 %.

Tehnica de lucru după Dallai şi Baroni-Urbani (1967):

— Se injectează animalele cu o soluţie de colcemid (1 : 20 000), 12 ore.

— După sacrificare, se recoltează măduva, splina şi gonadele, care se fragmentează în bucăţi foarte mici.

— Materialul astfel mărunțit este hipotonizat într-o soluție de citrat de sodiu.

În cazul preparatelor de tip squash : se face o fixare în acid acetic 50 % și se efectuează preparatele, iar colorarea se realizează în soluție Giemsa 4 % timp relativ îndelungat.

Pentru obținerea frotiurilor uscate la aer sau la flacără : se centrifughează materialul în soluție hipotonă, 5 minute, se elimină supernatantul și se adaugă fixator (alcool metilic absolut — acid acetic glacial, 3 : 1), iar din suspensia de celule în fixator (omogenizată prin agitare) se efectuează frotiurile ; colorarea se face în soluție Giemsa 4 %, timp relativ îndelungat.

Tehnica de lucru după Dallai și Talluri (1969) :

— Animalele se injectează cu colchicină, cu 12 ore înainte de sacrificare.

— După colchicinizare, animalele se decapitează, iar sîngele obținut este suspendat într-o soluție hipotonă de citrat de sodiu (1 %).

— Se centrifughează 5 minute și se fixează în alcool metilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1).

— Sedimentul se resuspendă prin barbotare și se centrifughează încă de două ori, iar celulele se resuspendă din nou în fixator.

— Din suspensia primară se fac frotiuri după tehnica uscării la aer și se colorează cu soluție Giemsa (2 %), timp de 8—10 ore.

Evidențierea cromozomilor în culturi de celule și țesuturi

Tehnica de lucru după Huang, Clark și Gans (1967) :

— Animalele au fost sacrificate și s-au prelevat : plămînul, inima și rinichiul, care se spală în mod repetat cu soluție Ringer.

— Se fragmentează în bucăți foarte mici și se introduc în flacoane de cultură sau în tuburi Leighton cu lamele.

— Culturile se realizează în mediul Eagle, care conține 10 % ser de vițel, la 30°C.

— După 4—7 zile, culturile se tratează cu colcemid 0,1 mg/ml mediu, timp de 4 ore, apoi se recoltează în soluție de tripsină (0,25 %).

— Hipotonia se realizează în soluție de citrat de sodiu 1 %, timp de 10 minute.

— Fixarea se face în alcool etilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1), 30 minute.

— Preparatele se efectuează după tehnica uscării la aer.

În cazul tuburilor Leighton, după timpul de creștere necesar, în mediu se adaugă 0,1 mg colcemid/ml de mediu, pentru 4 ore, și apoi 2 ml apă distilată, pentru 20 minute. Fixarea se realizează în alcool etilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1), iar colorarea cu soluție Giemsa.

Metoda culturilor de leucocite pe termen scurt :

— Sîngele a fost recoltat direct din inimă, cu o seringă heparinizată, și s-a transferat într-un vas de sticlă sau tub de centrifugă, în funcție de cantitatea obținută. Vasul cu sînge este pus în refrigerator pentru o oră.

— La unele specii, eritrocitele se depun în acest timp, la altele însă este necesară o centrifugare la turație mică, 300—400 rpm, timp de 3 minute, pentru separarea eritrocitelor.

— Se recoltează aproximativ 0,3 ml supernatant care conține leucocite, și se amestecă cu 5 ml mediu TC-199, 1 ml ser uman AB inactivat la cald și 0,1 ml fitohemaglutinină. Se incubează la 30°C, 97 de ore. După incubație se adaugă 0,015 μg dintr-o soluție de colcemid la 1 ml mediu, pentru 1—4 ore.

— Se elimină supernatantul prin centrifugare, iar sedimentul celular este tratat cu o soluție hipotonă de citrat de sodiu (0,95 %), timp de 15 minute.

— Se elimină soluția hipotonă prin centrifugare și sedimentul celular este fixat în alcool metilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1).

— Din suspensia de celule în fixator se efectuează frotiuri după ehnica uscării la aer.

3.1.4. Metode pentru studiul cromozomilor la păsări

Evidențierea cromozomilor in vivo

Tehnica de lucru după Ohno (1964) :

— Se folosesc păsări adulte, colchicinizate în prealabil, de la care se prelevă splina și gonadele.

— Materialul recoltat este supus unui tratament hipotonic în apă distilată, 10 minute.

— Fixarea se realizează în acid acetic 50 %.

— Se efectuează preparate squash, care se colorează cu soluție Giemsa.

Tehnica de lucru după Srb, Kral și Hrsal (1966) :

— Se injectează pui de găină în vîrstă de 1—8 zile, intraperitoneal, cu o soluție de colchicină (0,1 %), cu 3 ore înainte de sacrificare.

— Se recoltează tibiile din care se preia măduva osoasă, care se introduce într-un vas ce conține o parte soluție de citrat de sodiu bibazic (3,8 %) și trei părți apă bidistilată, astfel încît să rezulte o concentrație finală de aproximativ 0,9 %.

— Suspensia celulară se trece într-un tub de centrifugă, care se introduce în termostat la 37°C, timp de 15 minute.

— Se centrifughează la 1 500 rpm, 10 minute, se îndepărtează supernatantul și materialul rămas se fixează în alcool metilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1), 10 minute, la 4°C.

— Se centrifughează din nou, se decantează, se adaugă fixator proaspăt şi se lasă materialul la frigider, minimum 20 minute şi maximum o zi întreagă.

— Se centrifughează iarăşi la 1 500 rpm, 10 minute, se elimină supernatantul; peste sedimentul celular se adaugă 3—5 picături de acid acetic 80 % şi se completează cu acid acetic 45 %.

— După 5 minute, din suspensia obţinută în fixator se pot efectua frotiuri după metoda uscării la aer.

— Colorarea preparatelor se realizează în soluţie Giemsa, timp de 45 minute, după care lamele se spală în apă de robinet pentru a elimina excesul de colorant.

Evidenţierea cromozomilor în ţesuturi embrionare

— Se recoltează ţesut embrionar, de preferinţă ectoblast, din ouă incubate 5—15 zile şi se fragmentează fin. Fragmentele se supun unui tratament într-o soluţie de citrat de sodiu (0,9 %) şi colchicină (0,1 %), timp de 20—30 minute, la 30—37°C.

— Fixarea se realizează în alcool metilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1).

— Din materialul fixat se realizează preparate de tip squash în orceină acetică.

Evidenţierea benzilor R, G şi C la Gallus domesticus

Tehnica de lucru după Carlenius şi colab. (1981):

— Se recoltează piele şi ţesut muscular de la embrioni de 10 zile şi se cultivă în mediul Eagle cu HEPES în concentraţie finală de 2×10^{-2}M, suplimentat cu ser de viţel 20 %. Cultura se realizează la 37°C şi se foloseşte sub formă de cultură primară.

— Cu 3—4 ore înainte de recoltare se adaugă colchicină 1 μg/ml.

— După tripsinizare, celulele se tratează cu o soluţie de KCl 0,075M, timp de 10—15 minute.

— Fixarea se face în metanol — acid acetic glacial 3 : 1, în trei schimburi succesive.

— Preparatele se realizează după metoda uscării la aer.

Pentru obţinerea benzilor G se foloseşte tehnica descrisă de Wang şi Fedoroff (1971). Pentru obţinerea benzilor C se utilizează tehnica lui Sumner (1972) cu un tratament cu soluţie saturată de $Ba(OH)_2$ timp de 15 minute. Pentru identificarea benzilor R după tehnica lui Dutrillaux şi colab. (1973) se adaugă la mediul de cultură 300 μg/ml BUdR, cu 7 ore înainte de recoltare, apoi lamele se pun în tampon fosfat M 1/15, la pH 6,7 cel puţin o oră şi apoi se colorează cu acridinorange (3,5 mg/70 ml tampon fosfat M 1/15 la pH 6,7). După colorare, lamele se clătesc de două ori în tampon fosfat şi se montează în acelaşi tampon.

Evidenţierea cromozomilor în culturi de ţesuturi

Cele mai bune rezultate le-au dat culturile de ţesut renal.

Tehnica de lucru după Vegni-Talluri (1965):

— Se recoltează steril rinichii şi se spală în soluţie fiziologică căreia i s-au adăugat antibiotice (penicilină G 125 000 μg/l şi dihidrostreptomicină 12 μg/l).

— Se fragmentează în bucăţi foarte mici şi se repetă spălarea pentru a îndepărta orice urmă de sînge.

— Fragmentele sînt supuse unui tratament în soluţie de tripsină (0,25 %), la 37°C, pe un agitator electromagnetic. Tripsinizarea se opreşte prin răcire la 0°C (cu gheaţă).

— După 1—2 ore, individualizarea celulelor din ţesut este satisfăcătoare şi suspensia celulară poate fi trecută în tuburi de centrifugă cu răcire, unde se centrifughează 15 minute la 800 rpm.

— Se decantează supernatantul şi se adaugă mediu TC-199 şi ser de viţel 20 % (concentraţia optimă de celule este 300 000 celule/ml de mediu).

— Suspensia de celule în mediul de cultură este repartizată în tuburi de cultură Leighton care conţin lamele de 12 × 32 mm.

— Se incubează tuburile de cultură la 39°C, 48—72 de ore, după care se adaugă colcemid (1 μg/ml), pentru 4—6 ore.

— Lamele pe care au crescut coloniile de celule sînt trecute în mediu diluat cu 2 părţi apă distilată, timp de 20 minute.

— Se trece în fixator Bouin sau Helly, 15 minute.

— După o spălare prealabilă, lamele sînt colorate cu hematoxilină ferică Heidenheim sau cu reactivul Schiff.

Tehnica de lucru după Renzoni şi Vegni-Talluri (1966):

— Cultura se face după metoda descrisă anterior, folosind celule renale provenite de la păsări tinere şi adulte.

— Se incubează tuburile de cultură la 38°C, 72 de ore.

— Se colchicinizează cu colcemid $1{,}6—1{,}7 \times 10^{-7}$, 4 ore.

— Se centrifughează, apoi se îndepărtează mediul de cultură, iar sedimentul celular este suspendat într-o soluţie hipotonă de citrat de sodiu (1 %), la 37°C.

— Se centrifughează din nou, se îndepărtează soluţia hipotonă şi sedimentul celular se resuspendă în fixator (alcool metilic absolut — acid acetic glacial, 3 : 1).

— Din suspensia de celule în fixator se fac frotiuri, după tehnica uscării la aer sau la flacără, care se hidrolizează la 60°C, în HCl 1N, 5 minute, şi se colorează cu soluţie Giemsa 4 %, timp de 2—3 minute. Preparatele se pot permanentiza în balsam de Canada.

Tehnica de lucru după Yovanovic şi Atkins (1969):

— Se recoltează steril rinichii şi se trec în vase Petri care conţin mediu TC-199 şi 20 % ser de viţel. Se fragmentează în bucăţi de 1—2 mm^3.

— Într-un tub de cultură care conține: 50 ml de mediu format din: 60 % TC-199 + 20 % extract embrionar de găină + 20 % ser de viței + 0,5 ml antibiotice se introduc 4—5 fragmente de țesut renal. Se incubează la termostat la 37—39°C.

— Se controlează cultura sub lupă binoculară în fiecare zi, timp de 5—7 zile.

— Cu 20 de ore înainte de recoltare se schimbă mediul cu unul proaspăt, la care se adaugă colchicină.

— Se îndepărtează mediul și se adaugă soluție Hanks + 1 ml tripsină (0,20 %) și se reincubează pînă se desprind celulele de pe sticlă.

— Se transferă suspensia celulară într-un tub de centrifugă și se centrifughează 5 minute la 500 rpm, se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul celular este resuspendat într-o soluție hipotonă de citrat de sodiu 0,7 % + 0,1 ml Varidasă (amestec de streptodornează și streptokinază). Se reincubează la 37—39°C, 10 minute.

— Se centrifughează la 500 rpm, 5 minute, se decantează supernatantul, iar sedimentul se resuspendă într-un fixator proaspăt (alcool metilic absolut — acid acetic glacial, 3 : 1).

— Din suspensia de celule în fixator se fac frotiuri după tehnica uscării la aer.

3.1.5. Metode pentru studiul cromozomilor la mamifere

Evidențierea cromozomilor în măduva osoasă

Măduva osoasă hematogenă, datorită numărului mare de celule în diviziune, este considerată țesutul care se pretează cel mai bine la analiza directă a cromozomilor. Conform cercetărilor lui Rohr (1960), 10—42 % dintre eritroblaste și 6—11 % dintre mieloblaste se află în metafază în același timp. Datorită acestui indice mitotic ridicat, cantitatea de material necesar studiului este mică, iar tratamentul preliminar cu substanțe mitogene nu este necesar.

Pentru evidențierea cromozomilor în măduvă s-au pus la punct o serie de metode care prelucrează materialul biologic imediat după recoltare, după o scurtă incubare sau după o cultivare în diferite medii pe termen mai lung. Pe lîngă avantajul rapidității, metodele directe pot fi folosite în studiul citogenetic al leucemiilor deoarece celulele leucemice nu cresc *in vitro*.

1) Evidențierea cromozomilor direct din măduvă, fără incubare

Tehnica de lucru după Sandberg (1960):

— Se aspiră măduva din tibie, creasta iliacă, stern etc. și se spală într-o soluție rece de glucoză 0,6 % și NaCl 0,7 % sau într-o soluție izotonă Earle rece, timp de 10—15 minute.

— Se amestecă un volum de suspensie medulară cu 4 volume de citrat de sodiu 0,44 %, 15 minute.

— După o centrifugare ușoară, se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul celular se fixează cu acid acetic 50 % rece.

— Se schimbă fixatorul, după o nouă centrifugare, cu alcool metilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1).

— Se colorează celulele în suspensie cu soluție de orceină 1 % în acid acetic 65 %.

— Se efectuează preparate de tip squash.

Tehnica de lucru după Tjio și Whang (1962):

Se poate realiza chiar în laboratoare cu dotare limitată și prezintă două variante permițînd etalarea cromozomilor pe lamă fie prin procedeul squash, fie prin uscare la aer.

În cazul procedeului squash:

— Se aspiră cu o seringă de 0,5 ml măduvă osoasă hematopoetică sternală, tibială sau din creasta iliacă și se trece în 2—3 ml soluție de colchicină. Fragmentele se transferă apoi în altă soluție de colchicină, pentru 1—2 ore, la 20—30°C (soluția de colchicină este o soluție de NaCl 0,85 %, tamponată cu $6{,}6 \times 10^{-3}$ fosfat cu pH 7 la care se adaugă colchicină sau colcemid 0,3 mg/ml).

— Materialul medular se trece în 2—3 ml soluție hipotonă de citrat de sodiu în apă distilată (1 %), 30 minute, la 20—30°C.

— Se transferă apoi într-o sticlă de ceasornic, care conține cîteva picături de orceină acetică 2 %. La 9 volume de suspensie celulară se adaugă 1 volum de HCl 1N. Se încălzește la flacără mică, evitîndu-se fierberea, realizîndu-se concomitent fixarea și colorarea materialului.

— Din fiecare fragment de țesut medular se realizează preparate de tip squash în orceină acetică 2 %.

În cazul prelucrării materialului după metoda uscării la aer:

— Extractul medular se introduce în 2—3 ml soluție de colchicină (în concentrație de 0,3 mg colchicină sau colcemid/ml soluție de NaCl 0,85 % adusă la pH 7), timp de 1—3 ore.

— Se centrifughează la 400 rpm, timp de 4—5 minute, la temperatura camerei. Se înlătură supernatantul și se adaugă 2—3 ml soluție hipotonă de citrat de sodiu 1 %. Se agită fiola pentru a se uniformiza suspensia și se lasă la temperatura camerei, 30 minute.

— Se centrifughează în același mod, se îndepărtează supernatantul, se adaugă 5 ml fixator (alcool metilic absolut — acid acetic glacial, 3 : 1), se resuspendă celulele prin agitare și se lasă 25 minute. Această operație se repetă.

— Se centrifughează din nou, se îndepărtează supernatantul, se adaugă 0,2—0,5 ml fixator proaspăt și se omogenizează suspensia prin agitare.

— Cu o pipetă Pasteur se pun picături de 1—2 mm^3 pe lame foarte curate. Se suflă ușor pe fiecare picătură facilitînd astfel dispersia celulelor și uscarea preparatelor. Lamele se lasă să se usuce la aer.

— Colorarea se realizează cu orceină acetică 2 %, 10—12 minute, cu reactiv Schiff, soluție Giemsa, soluție Wright sau soluție de cresil-violet.

— Preparatele citologice se deshidratează în băi de alcool de diferite grade, se clarifică în două schimburi de alcool absolut, două schimburi de xilol şi se montează în Permount, euparal sau balsam de Canada.

Tehnica de lucru în Laboratorul de genetică de la Universitatea din Bucureşti:

— Animalele se injectează intraperitoneal, de preferinţă dimineaţa, cu o soluţie de colchicină 0,05 % în doză de 1 ml/100 g greutate corporală, timp de două ore, după care se sacrifică prin asfixiere cu eter.

— Se întind pe o placă de disecţie, se fixează cu ace şi apoi se dezarticulează femurele şi tibiile de la membrele posterioare (dacă animalele sînt mici se folosesc şi humerusurile).

— Se curăţă femurele şi tibiile de resturile musculare, se îndepărtează epifizele, iar în diafiză se perfuzează o soluţie hipotonă (0,75 %) de citrat de sodiu, la 37°C. Perfuzatul de ţesut hematopoetic se recoltează într-un tub de centrifugă şi se agită puternic pînă la realizarea unei suspensii omogene de ţesut în soluţie hipotonă.

— Materialul obţinut se introduce în termostat, la 37°C, 40 minute, timp în care se agită de cîteva ori.

— Se centrifughează la 1 000 rpm, timp de 15 minute, se îndepărtează supernatantul şi se adaugă fixator rece: alcool metilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1), prin picurare pe pereţii tubului. Se lasă materialul 30 minute la frigider, apoi se resuspendă celulele prin agitare şi se centrifughează din nou la 1 000 rpm, timp de 15 minute.

— Se înlătură supernatantul, se adaugă fixator rece şi se lasă din nou 30 minute la frigider.

— Se centrifughează în aceleaşi condiţii şi după înlăturarea supernatantului se adaugă o nouă cantitate de fixator proaspăt, în jet. Se păstrează la frigider pînă a doua zi.

— În ziua următoare se mai fac două fixări, iar din ultima suspensie de celule în fixator se fac frotiuri pe lame perfect degresate şi ţinute într-un recipient cu gheaţă.

— Frotiurile se spală bine în apă de robinet şi se colorează cu soluţie Giemsa 10 % + 3 ml soluţie de amoniac 0,5N, 10—20 minute.

2) Evidenţierea cromozomilor în măduvă după o perioadă de incubaţie

Tehnica de lucru după Ford şi colab. (1958):

— Se suspendă 50 picături de măduvă în 5—10 ml mediu TC-199 sau altă soluţie salină balansată care conţine 50—100 unităţi de heparină şi 0,5 ml soluţie de colcemid (0,4 %).

— Se incubează la 37°C, timp de 90 minute.

— Se centrifughează la 800 rpm, timp de 5 minute, se elimină supernatantul, iar sedimentul celular se resuspendă în 4 ml soluţie hipotonă (o parte soluţie Hanks + 3 părţi apă distilată, sau o soluţie de citrat de sodiu 1 %, sau o soluţie de KCl 0,075 M).

— Se centrifughează din nou, se elimină supernatantul şi se fixează sedimentul celular în fixator proaspăt (metanol absolut — acid acetic glacial, 3 : 1), 30 minute, la frigider.

— Se repetă fixarea cel puţin de 5 ori. Din ultima suspensie de celule în fixator se efectuează preparate după metoda uscării la aer.

Tehnica de lucru după Tolksdorf şi colab. (1965):

— Se suspendă măduva în 3 ml mediu (40 % ser uman, 30 % TC-199, 30 % soluţie Hanks; la 100 ml amestec se adaugă 5 ml ser de viţel) la care se adaugă 0,5 ml fitohemaglutinină şi 200 unităţi de heparină.

— Se pune suspensia celulară la frigider pentru 3 ore; după 24 de ore se schimbă mediul cu unul proaspăt, iar după 48 de ore de la incubare materialul se prelucrează în vederea obţinerii preparatelor cromozomiale.

3) Evidenţierea cromozomilor în culturi de măduvă osoasă pe termen lung

Aceste culturi pot fi folosite în studii biochimice, enzimatice sau investigaţii citologice pentru observarea celulelor vii, iar cînd se iniţiază culturi asemănătoare celor de leucocite (cu adăugare de fitohemaglutinină) se poate determina cariotipul tuturor componentelor sîngelui.

Lajtha (1952), Berman şi colab. (1955), Woodliff (1964) au arătat că în condiţii speciale de cultură, după aproximativ o săptămînă, celulele măduvei osoase formează un monostrat fibroblastic care poate fi folosit pentru obţinerea preparatelor cromozomiale. Fibroblastele nu derivă numai din elementele stromale ale măduvei, ci şi din ţesutul hematopoetic.

Pfeiffer (1973), modificînd tehnica lui Berman, recomandă următorul procedeu de lucru:

— Se incubează măduva în vase de cultură aşezate pe partea lor plată, într-un mediu care constă din: 40 % ser uman din cordon ombilical, 2 % extract de embrion de găină şi 58 % soluţie Hanks; pH-ul se ajustează la 7,6 cu o soluţie de $NaHCO_3$ 1,4 %.

— Se schimbă mediul cînd soluţia de roşu fenol (0,002 %) indică modificarea pH-ului.

— Celulele care nu aderă la sticlă se folosesc pentru subculturi, iar cele aderate sînt tratate ca şi culturile în monostrat pentru obţinerea preparatelor cromozomiale.

Chu şi Giles (1959) tratează suspensia de măduvă în soluţie Hanks cu heparină (1 : 20 000), la 4°C, apoi o incubează într-un mediu care constă din soluţie Eagle 15 %, ser uman 20 % şi extract de embrion ultracentrifugat 5 %.

Fraccaro şi colab. (1960) incubează suspensia de măduvă în vase Petri într-un mediu constituit din: ser uman 40 %, mediu TC-199 30 % şi soluţie Hanks 30 %. După 10—15 zile se realizează indicele mitotic optim.

Evidenţierea cromozomilor în sîngele periferic

Dificultatea cultivării celulelor din sîngele periferic rezidă în faptul că, numai în condiţii anormale sîngele conţine celule mitotice. Acest fenomen

are loc în cazul celulelor imature din măduva osoasă, în anemia pernicioasă, în anemiile hemolitice, în leucemii sau în cazul diseminării celulelor tumorale.

Numărul mare de celule în diviziune necesar unor studii citogenetice se poate obține numai prin activarea și transformarea celulelor imunocompetente cu ajutorul unor substanțe mitogene. Cel mai indicat mitogen pentru limfocitele umane și animale este fitohemaglutinina.

Principiul tuturor acestor metode de cultivare constă în incubarea sîngelui, leucocitelor sau limfocitelor într-un mediu de creștere cu adaos de fitohemaglutinină.

Evidențierea cromozomilor în culturi de sînge total

Arakaki și Sparkes (1963), Tips și colab. (1963) și Hungerford (1965) au obținut culturi de limfocite prin incubarea unei cantități mici de sînge, fără o separare prealabilă a eritrocitelor și granulocitelor. Datorită cantității mici de sînge folosit, aceste metode se numesc „micrometode". Ele sînt eficiente atît în prepararea cromozomilor din culturi de sînge uman, cît și din cel provenit de la alte mamifere și chiar de la unele specii de păsări.

Ulterior, într-o serie de laboratoare, s-au pus la punct diferite metode care diferă între ele prin cantitatea de sînge recoltat, compoziția mediului de creștere și durata tratamentului cu substanțe statmocinetice. Datorită acestui fapt s-a putut standardiza o micrometodă cu rezultate sigure (Pfeiffer, 1973) care constă în următoarele :

— Se recoltează steril (după o dezinfectare prealabilă cu alcool) 2—3 picături de sînge venos, din pulpa degetului sau din călcîi.

— Sîngele recoltat se introduce într-un flacon de cultură care conține : 6 ml mediu McCOY-5a, 2 ml ser fetal de vițel sau ser uman autolog sau omolog sau plasmă umană la care se adaugă 50—100 unități heparină și 0,1 ml fitohemaglutinină.

— Flacoanele, bine închise, se incubează la 37°C, 60—72 de ore.

— Cu două ore înainte de recoltare se adaugă 0,3 ml soluție de colcemid 0,04 % într-o concentrație finală de 12 μg/ml (în cazul folosirii colchicinei se adaugă 0,1 ml colchicină într-o concentrație finală de 0,8 μg/ml).

— După colchicinizare se face suspendarea într-un tub de centrifugă, se centrifughează 8 minute la 1 200 rpm, se îndepărtează cu atenție supernatantul, iar sedimentul celular se resuspendă în ultimele picături de supernatant rămase prin agitare.

— Se adaugă 8 ml de soluție hipotonă păstrată la 37°C și se lasă 10 minute la termostat (37°C).

— Se centrifughează iarăși 8 minute la 1 200 rpm, se îndepărtează supernatantul și sedimentul celular este resuspendat în fixator proaspăt (alcool metilic absolut — acid acetic glacial, 3 : 1).

— Se centrifughează din nou, se îndepărtează supernatantul, se adaugă fixator proaspăt într-o cantitate care să reprezinte de 5 ori volumul sedimentului celular și cu ajutorul unei pipete se resuspendă celulele în fixator.

— Se efectuează un frotiu de control prin punerea a 12 picături pe o lamă curată și se vizualizează la microscop. Dacă cromozomii nu sînt bine etalați se repetă fixarea.

— După efectuarea frotiurilor prin metoda uscării la aer sau flacără, ele se colorează cu soluție Giemsa.

Evidențierea cromozomilor în culturi de leucocite

În cazul metodelor de cultivare a leucocitelor din sîngele periferic se îndepărtează eritrocitele prin sedimentare sau centrifugare.

Tehnica de lucru după Moorhead și colab. (1960) :

— Cu o seringă heparinizată se extrag 10 ml sînge venos care se amestecă cu o soluție stoc de heparină comercială și cu 0,2 ml fitohemaglutinină.

— Vasul care conține sîngele se răcește în apă cu gheață, 30—60 minute, și se centrifughează imediat la 5°C și 25 rpm, 5—10 minute.

— Plasma supernatantă care conține leucocite este extrasă cu o seringă, introdusă într-un vas de cultură steril și agitată cu grijă, evitînd formarea de bule.

— Se numără leucocitele și cultura se inițiază cu $1—2 \times 10^6$ celule/ml. Ca medii de creștere se folosesc : 60—70 % mediu TC-199 sau mediu minim esențial suplimentat cu plasmă autologă 30—40 %, penicilină și streptomicină ; pH-ul mediului (7,0—7,2) se corectează prin barbotare cu CO_2 sau prin adăugare de NaOH.

— Se incubează la 37°C, timp de 3 zile.

— Se prelucrează în vederea obținerii cromozomilor ca în cazul culturilor de sînge total.

Tehnica de lucru după Mellman (1965) :

— Într-o seringă în care se aspiră 0,1 ml heparină, se recoltează 5—10 ml sînge venos (care se amestecă prin răsturnarea seringii).

— Se aspiră și sîngele din acul seringii pînă cînd în acesta se formează un spațiu mic. Se șterge acul cu alcool, se acoperă cu un înveliș steril și se lasă seringa în poziție verticală, pe piston, o oră, la temperatura camerei. Se observă periodic pînă ce circa 30—40 % din volumul sîngelui s-a clarificat.

— Se întoarce seringa în poziție orizontală și se trece plasma într-un tub de centrifugă steril ; plasma poate fi păstrată la 5°C, timp de 3—4 zile, pînă la inițierea culturilor.

Într-un vas de cultură steril cu o capacitate de 20 ml se introduce 0,5—1 ml suspensie celulară conținînd de obicei 10^7 leucocite. Se adaugă mediul nutritiv alcătuit din : 1 ml plasmă autologă, ser uman AB sau ser de vițel, 6 ml mediu TC-199, 0,03—0,05 ml bactofitohemaglutinină/P

(o fiolă se dizolvă în 5 ml apă distilată), o soluţie de antibiotice care conţine 0,02 ml penicilină şi streptomicină 100 mg/ml.

— Vasul de cultură se închide ermetic cu un dop de cauciuc atoxic, sterilizat, şi se incubează la termostat la 37°C.

— În a treia zi (60—70 de ore) se adaugă 0,05 ml soluţie de colchicină în concentraţie finală de 0,05 mg/ml mediu.

— După 2—4 ore, celulele sînt suspensate în mediu, transferate într-un tub de centrifugă şi centrifugate 5 minute, la 500—800 rpm, după care se înlătură mediul supernatant. Celulele sînt spălate în 5 ml soluţie Hanks tamponată şi se recentrifughează. Se îndepărtează din supernatant pînă la diviziunea 0,5 ml de pe tubul de centrifugă. Celulele se resuspendă în acest volum de soluţie cu o pipetă Pasteur şi se adaugă 2 ml apă distilată. Se lasă 8—10 minute la temperatura camerei.

— Se resuspendă celulele şi se centrifughează la fel ca înainte, apoi se îndepărtează întreaga cantitate de lichid hipoton.

— Se adaugă peste sedimentul de celule cîţiva mililitri de fixator proaspăt preparat (3 volume alcool metilic absolut/1 volum acid acetic glacial) prin picurare lentă pe pereţii tubului. Se lasă 20—30 minute, se îndepărtează fixatorul, se adaugă o cantitate mică de fixator proaspăt şi se suspendă din nou materialul celular. După 20 minute se face din nou o centrifugare, adăugînd o cantitate proaspătă de fixator. Se repetă procedeul încă odată sau de două ori pînă la obţinerea unei suspensii celulare omogene şi opalescente. Din această suspensie se fac frotiuri, pe lame foarte curate, după tehnica uscării la aer sau la flacără.

— Colorarea se face în soluţie Giemsa 10 % + 3—5 ml soluţie 0,15 N de NH_4OH şi se controlează la microscop. Colorantul se utilizează o singură dată. În general, după 5—6 minute lamele sînt scoase din colorant şi spălate.

— Lamele se pot permanentiza prin montare în răşini sintetice sau în balsam de Canada.

Metodă standard:

— Se extrag 10—20 ml sînge venos şi se pun într-un vas care conţine 100—200 unităţi heparină.

— Se aşază seringa cu acul în sus pînă se formează 2—4 ml plasmă supernatantă (aproximativ 120 minute).

— Se ataşează un ac steril, se înclină seringa la 135° şi cu grijă se injectează plasma cu celule într-un vas de cultură steril.

— Se diluează plasma cu mediul TC-199, în proporţie de 1 : 2, şi se distribuie cîte 5—8 ml în fiecare vas de cultură; se adaugă cîte 0,1 ml fitohemaglutinină şi se incubează la 37°C, timp de 60—72 de ore.

— Cu două ore înainte de colectarea celulelor se adaugă 0,3 ml colcemid soluţie 0,4 %, avînd o concentraţie finală de 12 μg/ml.

— Se prelucrează materialul în vederea evidenţierii cromozomilor, ca în tehnica anterioară, şi se realizează preparate după metoda uscării la aer.

Evidenţierea cromozomilor în culturi de ţesuturi

În general, culturile de fibroblaste se pot iniţia din material provenit din diverse ţesuturi, prin biopsie sau autopsie, recoltat în condiţii strict aseptice. Metodele sînt numeroase şi toate se bazează pe acelaşi principiu: prelevarea sterilă a explantelor, fragmentarea lor şi introducerea într-un mediu nutritiv. În aceste culturi primare, celulele care se divid sînt heterogene, predominînd celulele epiteliale şi fibroblastice, în funcţie de materialul cultivat, dar după un timp (chiar după prima subcultivare) se vor observa numai fibroblaste. Cînd în vasul de cultură se formează un strat celular dens, se îndepărtează fragmentul de ţesut, se face o subcultivare din care se pot face apoi subculturi ulterioare sau se prelucrează (în faza logaritmică) în vederea analizei cromozomiale.

Evidenţierea cromozomilor în culturi de fibroblaste. Deşi din orice ţesut se pot obţine culturi de celule, pentru lucrările de rutină se folosesc de obicei explante de piele (prin biopsie sau autopsie în primele 48 de ore), muşchi, fascie, peritoneu şi pericard. La mamifere, în general, plămînul dă rezultate bune cu condiţia să fie proaspăt, altfel se infectează foarte repede.

Metodele pentru obţinerea culturilor de celule se pot grupa în:

— Metode în care ţesutul se disociază în aşa fel încît în mediul de cultură se introduc celule care prin multiplicare formează un strat compact pe peretele vasului de cultură;

— Metode în care se cultivă fragmente de explant din care migrează celule, se multiplică şi, în final, formează un strat de celule pe peretele vasului de cultură.

Obţinerea culturilor din explant de piele. Hardnen şi Brunton (1965) iniţiază culturi de explant de piele, modificînd tehnicile lui Froland (1961) şi Basur şi colab. (1963).

Tehnica de lucru:

— Se dezinfectează pielea cu alcool medicinal, apoi se prinde o cută de piele între capetele unui forceps, se ţine strîns pînă se albeşte pielea şi se secţionează un fragment de 15 × 2 mm, cu o lamă sterilă.

— Se trece materialul recoltat în 5 ml mediu de creştere, într-un vas de cultură steril de 5 ml.

— Se transferă conţinutul într-un vas Petri şi se înlătură cea mai mare parte din lichid.

— Se taie în fragmente mici (aprox. 0,5 mm în diametru).

— Cu o pipetă Pasteur se transferă aproximativ 4 fragmente de ţesut într-un vas Petri şi se plasează uniform lîngă centrul vasului.

— Se acoperă cu o lamelă sterilă şi se presează moderat cu vîrful forcepsului. Se adaugă 5 ml mediu de creştere şi se introduce în incubator la 37°C, în atmosferă umedă, cu 5 % CO_2. În mod normal, în 2—3 zile se observă celule epiteliale şi fibroblastice, iar în 2—3 săptămîni o extindere a zonei de creştere a fibroblastelor în jurul fragmentelor.

— Cînd creşterea fibroblastelor este corespunzătoare, se scot lamele şi se introduc într-un vas Petri de 5 cm, în 5 ml mediu de creştere. După

cîteva zile, celulele crescute pot fi folosite pentru subcultivare (şi celulele de pe lamelă pot fi subcultivate).

— Se îndepărtează mediul şi se spală cu 5 ml soluţie Dulbecco A. Se adaugă 2 ml soluţie Versen — tripsină preîncălzită.

— Se îndepărtează imediat cea mai mare parte din soluţia de Versen — tripsină, lăsînd aproximativ 0,5 ml. Se incubează la termostat la 37°C, 10—15 minute.

— Se adaugă 5 ml mediu de creştere şi celulele se suspendă uşor, cu ajutorul unei pipete Pasteur.

— Jumătate din suspensia celulară se împarte în două vase noi şi se completează mediul pînă la 5 ml.

— Subculturile se reincubează la 37°C şi se schimbă mediul de creştere la fiecare 2—3 zile.

— După 24 de ore de la subcultivare, fibroblastele pot fi folosite pentru evidenţierea cromozomilor.

— Se adaugă 0,5 ml colcemid 0,2 % la 5 ml mediu de cultură şi se lasă la 37°C, timp de o oră.

— Se elimină mediul cu colcemid şi se spală celulele cu soluţie Dulbecco A (supernatantul se păstrează).

— Se adaugă 2 ml soluţie de Versen — tripsină şi se îndepărtează imediat, reţinîndu-se aproximativ 0,5 ml.

— Se incubează la 37°C, aproximativ 10—15 minute (pînă cînd se desprind celulele), se adaugă supernatantul şi se transferă suspensia celulară într-un tub de centrifugă.

— Se centrifughează la 800 rpm, 5 minute, se îndepărtează supernatantul şi se resuspendă celulele într-o soluţie de KCl 0,075 M preîncălzită la 37°C.

— Se incubează într-o baie de apă la 37°C, 10 minute, apoi se centrifughează la 800 rpm, 5 minute.

— Se îndepărtează supernatantul şi se resuspendă materialul în cantitate mică de lichid provenit de pe pereţii tubului de centrifugă.

— Se adaugă fixator proaspăt (alcool metilic absolut — acid acetic glacial, 3 : 1), picătură cu picătură, agitînd continuu. După ce s-a obţinut o suspensie bună a celulelor în fixator, se adaugă un exces de fixator în care se lasă cel puţin 30 minute şi se repetă fixarea în aceleaşi condiţii (celulele pot fi lăsate fie în primul, fie în cel de-al doilea fixator timp de cîteva zile, dar după o fixare prelungită se întăresc).

— Înainte de efectuarea preparatelor, se schimbă fixatorul şi se resuspendă celulele într-o cantitate mică de fixator proaspăt.

— Se plasează 1—2 picături din această suspensie pe o lamă curată şi se lasă să se usuce la temperatura camerei.

— Se colorează cu orceină acetică 2 %, timp de 2—3 ore, la 37° C, sau peste noapte, la temperatura camerei.

— Se clătesc lamele în acid acetic 45 %, se deshidratează în două schimburi de Cellosolve (etilen-glicol-monoetil-eter), se spală în esenţă de euparal 2 minute, şi se montează în euparal.

Şi alte ţesuturi pot fi folosite pentru obţinerea şi prelucrarea unor culturi asemănătoare.

Obţinerea culturilor primare din fragmente de embrion uman, organe de embrion uman sau de hamster auriu, biopsie de mucoasă intestinală,

tumori de hamster auriu. Această metodă evită individualizarea celulelor din ţesuturi prin tripsinizare (detalii de tehnică vezi în Raicu şi Nachtigal, 1969).

Obţinerea de culturi celulare prin disociere enzimatică. Aceste metode sînt mai rar folosite deoarece nu toate ţesuturile pot fi disociate suficient în celule independente. De obicei, pentru iniţierea culturii se foloseşte ţesut renal sau material provenit de la avortoni.

Tehnica de lucru după Parker (1961) :

— Se fragmentează eşantioanele de ţesut şi se spală, în mod repetat, cu o soluţie salină fiziologică pentru a îndepărta eritrocitele.

— Se transferă materialul într-un vas Erlenmeyer steril şi se amestecă cu o soluţie de tripsină (0,25—0,5 %) în cantitate de 4—5 ori mai mare decît cantitatea de material.

— Amestecul se agită la un agitator magnetic, reglat la turaţie maximă, timp de 10—15 minute.

— Suspensia se lasă în repaus 1 minut, după care supernatantul este pipetat într-un tub de centrifugă.

— După centrifugare, celulele se suspendă în mediu de cultură şi se trec într-un vas de cultură.

— Se incubează timp de 2 zile, se schimbă mediul, iar în a 3-a zi celulele ocupă aproximativ 3/4 din suprafaţa peretelui vasului de cultură.

Evidenţierea cromozomilor în tumori solide

În maladia canceroasă este esenţială cunoaşterea cariotipului tumoral. Deoarece în cultura de tumori solide este favorizată selecţia celulelor normale, pentru determinarea cariotipului tumoral se utilizează numai acele metode care evidenţiază cromozomii direct în tumori sau după o perioadă scurtă de incubaţie. În acest scop, imediat după recoltare, o parte din materialul tumoral este introdusă într-un vas care conţine mediu de creştere complet, iar o altă parte în alt vas în mediu de creştere cu 0,2 % colcemid. Prima probă se foloseşte pentru o incubare pe termen scurt, cea de-a doua pentru prelucrarea directă.

În cazul prelucrării directe :

— Imediat după recoltare ţesutul tumoral se fragmentează mărunt în mediu de creştere suplimentat cu colcemid.

— Se introduce vasul cu material într-o baie de apă la 37°C, 3 ore.

— Se transferă fragmentele cele mai mici (care se află în suspensie în mediu), împreună cu mediul de cultură, într-un tub de centrifugă conic.

— Se centrifughează, se îndepărtează supernatantul şi se realizează succesiv : hipotonia, fixarea şi efectuarea preparatelor ca şi în cazul prelucrării celulelor provenite din explant de piele.

În cazul prelucrării materialului după o perioadă de incubaţie :

— Se fragmentează materialul tumoral în 5 ml mediu de creştere.

— Se incubează într-o baie de apă la 37°C, 21 de ore.

— Se adaugă 0,5 ml colcemid (0,02 %) și se reincubează la 37°C, 3 ore.

— Dacă este cazul, se continuă fragmentarea pentru a se obține o suspensie cît mai bogată.

— Se transferă materialul fragmentat, împreună cu mediul, într-un vas de centrifugă conic și se lasă să se depună fragmentele mari.

— Se recoltează suspensia celulară supernatantă și se prelucrează în vederea obținerii preparatelor ca în cazul anterior.

Evidențierea directă a cromozomilor în țesuturi embrionare

Studiul citogenetic al țesuturilor embrionare provenite de la avortoni prezintă un interes deosebit pentru genetica medicală. Cele mai bune rezultate se obțin pe material provenit de la embrioni de 10—12 săptămîni. Ca material se preferă: ficatul, splina, rinichiul, extremitățile sau părți de craniu.

Tehnica de lucru după Evans și colab. (1971):

— Fragmentele de embrion (de cîțiva mm) se pun imediat după recoltare (sau în primele 30 minute), în cîțiva ml de mediu TC-199 sau McCOY-5a cu 0,05 μg/ml colcemid, în care se păstrează cîteva ore sau peste noapte, la 4°C; se obține o suspensie celulară prin fragmentare și agitare.

— Cînd se folosesc fragmente mari, de exemplu părți ale extremităților, acestea nu se mai mărunțesc, ci se plasează într-o soluție hipotonă, la temperatura camerei, 10—15 minute. Se îndepărtează supernatantul și se înlocuiește cu fixator proaspăt. Fixatorul se schimbă de două ori la interval de 5 minute, iar fragmentele sînt trecute într-un vas Petri sau o sticlă de ceas. Se adaugă acid acetic 60 % în cantitate de 4 ori volumul țesutului. După 5 minute, fragmentele se agită în fixator pentru a elibera celulele. În ambele cazuri, suspensia de celule obținută se prelucrează pentru obținerea de preparate cromozomice după metoda uscării la aer.

Evidențierea cromozomilor în celule din lichidul amniotic

Studiul citogenetic al celulelor din lichidul amniotic, direct sau în cultură, s-a dovedit a fi foarte eficient: în cazuri cum sînt, vîrsta mai avansată a mamei (peste 40 de ani), translocații familiale, boli X-linkate sau sarcini care urmează după decesul unui copil cu o aberație cromozomială spontană, în care se recomandă diagnosticul citogenetic prenatal.

Lichidul amniotic se obține prin amniocenteză transabdominală între săptămînile a 13-a și a 18-a de sarcină, cînd cantitatea de lichid care se poate realiza este de 10—40 ml, iar celulele viabile reprezintă 50 %. Ca morfologie, celulele din lichidul amniotic sînt eterogene, provenind din amnion, piele, tractul urogenital, aparatul digestiv și respirator. Există

și celule 4*n*, a căror proporție variază de la 0 la 100 %, și care provin din amnion. De aceea, tetraploidia este diagnostic nesemnificativă, fiind compatibilă cu nașterea unui copil normal.

Tehnica de lucru după Nadler și Gerbie (1970):

— Se centrifughează 10—15 ml lichid amniotic la 100 rpm, 10 minute, la temperatura camerei.

— Se suspendă sedimentul celular în 0,1—0,2 ml lichid amniotic sau în ser fetal de vițel 100 %.

— Se pune o picătură din această suspensie într-un vas Petri de 35 × 10 mm peste care se așază o lamelă sterilă pentru a imobiliza celulele, iar vasele Petri se introduc într-un incubator cu CO_2, la 37°C, 20 minute.

— Se adaugă 2—3 ml mediu de cultură (500 ml mediu Han F-10 + 75 ml ser fetal de vițel + 5 ml amestec antibiotic-antimicotic care conține 10 000 unități penicilină, 10 000 μg streptomicină și 250 μg fungizon/ml) și se incubează într-o atmosferă de CO_2 5 %, la 37°C.

— Se schimbă mediul după 4—5 zile.

— După alte 7—18 zile, cînd se observă un număr suficient de colonii celulare, se îndepărtează mediul, lamela se întoarce cu fața pe care s-au prins și înmulțit celulele în sus și se plasează în alt vas Petri.

— Se adaugă mediu în ambele vase (cel originar și cel care conține lamela). Celulele din vasul original, de obicei sînt menținute în culturi pe termen lung.

— După 8 ore, în vasul care conține lamela se adaugă 0,1 ml de colcemid (0,4 mg/ml) la ml de mediu.

— După 4—6 ore se îndepărtează mediul, iar lamela se clatină ușor într-o soluție hipotonă (5 părți apă distilată și o parte ser fetal de vițel) și se incubă în soluție hipotonă la 37°C, 30 minute.

— Se îndepărtează soluția hipotonă și se adaugă fixator. După 60 minute se îndepărtează fixatorul și se adaugă fixator proaspăt pentru aceeași perioadă de timp.

— Se clătește lamela în acid acetic 45 %, 5 minute, și se așază cu celulele în sus pe lamă; se adaugă cîteva picături de acid acetic 45 %.

— Se ridică ușor lamela și se trece deasupra unei flăcări în vederea unei bune etalări a cromozomilor.

— Surplusul de fixator se îndepărtează și lamela se trece în metanol pentru 5 minute.

— Se colorează cu soluție Giemsa (1 ml soluție Giemsa la 19 ml soluție tampon fosfat de sodiu) 20 minute.

În același laborator se mai utilizează și o altă tehnică

— Se lasă celulele să crească în vase de cultură pînă se acumulează o cantitate suficientă.

— Se adaugă colcemid (0,1 ml soluție din 0,4 mg/ml la 1 ml soluție).

— Celulele se desprind prin tripsinizare (0,1—0,2 ml tripsină 0,25 %), iar suspensia celulară se centrifughează la 100 rpm, 10 minute.

— Sedimentul celular este resuspendat în soluție hipotonă, la 37° C, 10 minute.

— Se elimină supernatantul și se adaugă fixator, pentru 30 minute, la 4°C.

— Se repetă fixarea și după alte 30 minute, sedimentul celular se resuspendă într-o cantitate redusă de fixator.

— Din ultima suspensie de celule în fixator se realizează preparate după metoda uscării la aer.

Tehnica de lucru după Gray și colab. (1971):

— Peste concentratul celular se adaugă 2 ml lichid amniotic și se incubează timp de 2—4 zile.

— Se schimbă mediul cu lichid amniotic autolog sau heterolog și cu cîteva ore înainte de recoltarea celulelor se adaugă colcemid.

— După aproximativ 7—14 zile, celulele se tripsinizează și suspensia celulară se prelucrează în vederea obținerii preparatelor.

3.2. Metode pentru studiul cromozomilor în meioză

Metodele de bandare cromozomială au permis înregistrarea unor progrese considerabile în studiul cromozomilor la animale. Cu toate acestea, unele aberații de tipul translocațiilor reciproce, inserțiilor sau inversiunilor nu pot fi detectate prin analiza metafazelor mitotice bandate. De aceea se impune completarea studiului cromozomilor mitotici cu studiul cromozomilor în meioză, unde unele aberații ca, de exemplu, inversiunile pot fi ușor indentificate prin apariția „buclei de inversiune". Analiza modului de împerechere a cromozomilor omologi dă indicații privind fertilitatea sau sterilitatea, precum și asupra modului de transmitere a unor deficiențe de la o generație la alta. Un plus de informație furnizează analiza meiotică atunci cînd se realizează pe preparate bandate după diferite tehnici.

3.2.1. Metode pentru studiul cromozomilor la pești

La unii pești, testiculele au o activitate intensă aproape tot anul, la alții doar cu 1—2 luni înaintea perioadei de reproducere; de aceea, în această perioadă se poate renunța la tratamentul cu colchicină, mai ales că după un tratament de peste 4 ore apar multe metafaze poliploide, care îngreuiază stabilirea numărului haploid.

Tehnica de lucru după Denton (1973):

— Se injectează animalele cu 0,1—1 ml colchicină (0,1 %) intraperitoneal, timp de 4 ore.

— Se recoltează testiculele, se spală în apă de robinet și se transferă în apă distilată pentru 20—30 minute; dacă materialul se prelucrează după metoda squash, materialul se trece în citrat de sodiu 0,9 %, pentru 10 minute.

— În cazul în care se realizează frotiuri uscate la aer, se îndepărtează soluția hipotonă prin centrifugare și se fixează într-un amestec de metanol — acid acetic glacial (3 : 1) 10 minute, la temperatura camerei. Se înlătură fixatorul prin centrifugare și se face o nouă fixare, timp de 5 minute. Cu o pensă curbă, țesutul se aplică pe o lamă curată uscată, se înlătură resturile de țesut, și se usucă la aer pentru cel puțin 30 minute. Se colorează cu orceină acetică, 10 minute, sub lamelă.

— În cazul preparatelor squash, țesutul hipotonizat se imersionează direct în orceină acetică (2 %), 10—20 minute. Se scoate țesutul și se aplică pe o lamă curată. După îndepărtarea resturilor tisulare rămîne o aglomerare de celule peste care se adaugă o picătură de colorant proaspăt și se acoperă cu lamela. Se îndepărtează bulele de aer și se realizează preparatele.

Tehnica de lucru în Laboratorul de genetică de la Universitatea din București:

— Se prelevă testiculul de la animale colchicinizate, se fragmentează într-o soluție hipotonă de KCl 0,075 M și se agită cu un agitator magnetic, 30—45 minute, la temperatura camerei.

— Se înlătură soluția hipotonă prin centrifugare la 1 500 rpm, 15 minute.

— Se fixează într-un amestec de alcool metilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1), 30 minute, la 4°C.

— Se face o nouă fixare în fixator proaspăt, îndepărtînd fixatorul vechi după centrifugare.

— Din suspensia de celule în fixator se pot face frotiuri după metoda uscării la aer sau se lasă la frigider peste noapte; în ultimul caz, urmează o nouă centrifugare și o nouă fixare în aceleași condiții.

— Se colorează cu soluție Giemsa (10 %), 10—20 minute.

3.2.2. Metode pentru evidențierea cromozomilor la amfibieni

Pentru studiul spermatogenezei la diferite specii de *Triturus* se utilizează următoarea metodă:

— Țesutul gonadal fragmentat se fixează în alcool etilic absolut — acid acetic (3 : 1), timp de 2—3 ore.

— O mică porțiune din testicul se trece pe o lamă într-o picătură de carmin acetic 2 % + acetat de fier și se examinează la microscop cu obiectiv mic; dacă se observă spermatocite în diviziune, materialul se acoperă cu o lamelă și se presează ușor.

— Preparatul astfel obținut este trecut într-un vas cu acid acetic 10 % pentru desprinderea lamelei.

— Se colorează în soluție de carmin acetic și acetat de fier, 10 minute.

— Se spală rapid în alcool etilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1), se deshidratează în seria de alcooli și se trece într-o baie de xilol înainte de montarea în balsam de Canada.

3.2.3. Metode pentru evidențierea cromozomilor la păsări

Tehnica de lucru după Slizynski (1964):

— Se sacrifică masculi de rață după colchicinizare, se preiau testiculele, se trec într-o soluție de citrat de sodiu hipotonă și se taie în fragmente mici, cu latura de 1—2 mm.

— Materialul se fixează în carmin acetic, în care poate fi păstrat, la frigider, chiar 3—4 zile.

— Se efectuează preparate de tip squash în orceină acetică — orceină lactică sau în reactivul Schiff.

3.2.4. Metode pentru studiul cromozomilor la mamifere

Tehnica de lucru după Welshons (1962):

— Se extirpă testiculul și se introduce într-o soluție de citrat de sodiu 0,7 % într-un vas Petri; se îndepărtează albugineea, iar tubii seminiferi sînt trecuți 15—20 minute într-un vas mic care conține 3 ml soluție de citrat de sodiu.

— Se adaugă, foarte încet, 3 ml acid acetic glacial.

— Se scoate un tub seminifer, se pune pe o lamă curată într-o picătură de orceină lactoacetică (2 g orceină + 50 ml acid acetic glacial + 42,5 ml acid lactic 85 % + 7,5 ml apă distilată), 10 minute.

— Se aplică peste preparat o lamelă și se mai lasă 10 minute pentru desăvîrșirea colorației.

— Se efectuează preparate de tip squash.

Tehnica de lucru după Evans și colab. (1964):

— Se prelevă testiculul, se îndepărtează albugineea, iar tubii seminiferi se trec într-o soluție de citrat de sodiu (2,2 %).

— Se trece materialul într-o *soluție proaspătă* de citrat de sodiu și se destramă conținutul tubilor seminiferi cu ajutorul unei pense pînă cînd devin plați, depunîndu-se pe fundul vasului.

— Se transferă supernatantul într-un tub de centrifugă, se centrifughează la 500 rpm, 5 minute.

— Se elimină supernatantul, iar sedimentul celular se resuspendă în 3 ml citrat de sodiu (1 %) și se lasă la temperatura camerei, 12 minute.

— Suspensia celulară se împarte în două părți egale, se centrifughează la 500 rpm, 5 minute, se elimină cea mai mare parte din supernatant, iar sedimentul celular se resuspendă în lichidul rămas.

— Peste suspensia celulară se adaugă fixator: alcool metilic absolut — acid acetic glacial (3 : 1) cu urme de cloroform și se lasă 5 minute.

— Se centrifughează din nou, în aceleași condiții, se elimină supernatantul și se resuspendă în fixator proaspăt, 10 minute.

— Se schimbă din nou fixatorul și din ultima suspensie de celule în fixator se realizează frotiuri prin uscare la aer.

Se poate folosi și următoarea **variantă a acestei metode:**

— Materialul provenit din biopsie testiculară este trecut într-o soluție hipotonă de citrat de sodiu (1 %), 30 minute.

— Se mărunțesc tubii seminiferi în fragmente foarte fine, într-un vas Petri (se îndepărtează fragmentele mai mari).

— Supernatantul se pune într-un tub de centrifugă și se centrifughează la 1 500 rpm, 10 minute.

— Se îndepărtează cea mai mare parte din supernatant, iar în lichidul rămas se resuspendă sedimentul.

— Se adaugă fixator alcool metilic — acid acetic glacial (3 : 1), de două ori mai mult decît suspensia celulară, picurînd ușor pe marginea eprubetei.

— Se centrifughează la 1 500 rpm, 5 minute, se elimină supernatantul și se resuspendă sedimentul în 5 ml fixator proaspăt; se lasă la temperatura camerei, 30 minute.

— Se centrifughează la 1 500 rpm, 10 minute, iar sedimentul se resuspendă în 1 ml fixator proaspăt.

— Din suspensia celulară în fixator se efectuează preparate după metoda uscării la aer, se colorează cu soluție Giemsa, orceină acetică sau fucsină carbonică.

Tehnica de lucru după Ohno (1965):

— Se utilizează material testicular recoltat fie prin biopsie, fie prin necropsie la cîteva ore de la deces, pentru obținerea diferitelor stadii ale profazei I.

— Se fragmentează țesutul testicular în cuburi cu latura de 2 mm; fragmentele se introduc într-o soluție izotonă (soluție Hanks sau mediu 858), 10 minute, la 4°C.

— Se repetă de două ori tratamentul cu soluție hipotonă, în aceleași condiții.

— Se fixează într-un amestec de acid acetic glacial și apă distilată în părți egale, 15—45 minute; pentru o fixare bună se recomandă ca volumul fixatorului să fie egal cu de 50 de ori volumul materialului de fixat.

— Se pun pe o lamă un fragment fixat și 0,1 ml fixator și se scot celulele din țesut prin presarea ușoară a fragmentului pe lamă (se îndepărtează resturile de țesut conjunctiv).

— Celulele rămase pe lamă se acoperă cu o lamelă, foarte atent ca să nu rămînă bule de aer între lamă și lamelă.

— Se efectuează preparate de tip squash prin presare foarte ușoară, pentru a nu se deteriora preparatul.

— După ce preparatul a fost introdus într-un amestec de gheață carbonică și metanol se desprinde lamela de lamă cu ajutorul unei lame de ras.

— Se usucă la aer și se introduce în metanol 15 minute.

— Se usucă din nou, se spală în apă de robinet și se hidrolizează în HCl 1N, la 60°C, 15 minute.

— Se colorează fie cu reactiv Schiff, 3 ore, fie cu soluție Giemsa, 5 minute, fie cu o soluție de fucsină bazică 0,25%, 1 minut.

— Se usucă si se montează.

Tehnica de lucru după Hungerford (1971):

— Se analizează cromozomii pachitenici umani.

— Tubii seminiferi obținuți prin biopsie sînt fragmentați într-o soluție salină Earle balansată (BSS), la 37°C.

— Suspensia obținută este colectată într-un tub de centrifugă conic.

— După centrifugare, cea mai mare parte a suspensiei supernatante este pipetată într-un alt tub de centrifugă, se centrifughează la 150 rpm, 4 minute, iar sedimentul este resuspendat într-o soluție de KCl 0,125 M, la care se adaugă heparină (20 000 U/l) și se incubează la 37°C, o oră.

— Se centrifughează, se îndepărtează soluția hipotonă și se fixează într-un amestec de metanol — acid acetic glacial (3 : 1), 10—15 minute.

— Se efectuează preparate după metoda uscării la aer și se colorează într-o soluție de orceină neutră în acid acetic 60%, timp de două ore.

3.3. Metode de evidențiere a benzilor cromozomiale

După publicarea rezultatelor lui Caspersson referitoare la bandarea cromozomilor prin colorare cu quinacrină și vizualizare în UV, s-au pus la punct o serie de metode speciale de colorare, capabile să producă benzi cromozomiale permanente care pot fi examinate și fotografiate la microscoapele fotonice uzuale. În această perioadă, o serie de cercetători, studiind relația dintre heterocromatina structurală și ADN satelit pe nucleii interfazici și metafazici, au furnizat o serie de date care au constituit puncte de inițiere în elaborarea unor metode de bandare.

Astfel, metoda lui Yunis (1971) stă la baza tehnicilor de obținere a benzilor cromozomiale prin tratament termic și colorație Giemsa. Tot în 1971 s-au pus la punct metoda benzilor R (Dutrillaux și Lejeune), o serie de metode de bandare G (Sumner, 1971; Drets și Shaw, 1971) și s-au pus bazele altor metode de bandare G prin digestie enzimatică (Dutrillaux și colab., 1971; Seabright, 1971).

3.3.1. Metode de bandare Q

Comparînd toate tipurile de benzi cromozomiale, se pare că benzile Q sînt cele mai reproductibile și cel mai puțin sensibile la diferitele tehnici de preparare a lamelor. Dezavantajul major al benzilor Q este timpul

scurt de fluorescență, ceea ce constituie o mare dificultate în fotografiere. Uneori, lamele se pot recolora dar calitatea fluorescenței scade. Toate tehnicile pentru obținerea benzilor Q implică o colorare a celulelor cu fluorocromi și expunerea lor la lumină ultravioletă a unui microscop cu fluorescență.

O condiție esențială pentru a obține benzi de bună calitate este calitatea preparatelor cromozomiale: cromozomii să fie prometafazici (cu cromatide mai lungi) și bine etalați în placa ecuatorială.

Rezultate foarte bune se obțin pe preparate proaspete, dar benzi bune se pot obține și pe lame vechi, chiar de cîțiva ani. Se recomandă ca lamele necolorate să fie păstrate fie la temperatura camerei (pentru timp scurt), fie la frigider (pentru o durată mai lungă).

Principiul tuturor metodelor de bandare constă în afinitatea pe care o manifestă unii fluorocromi pentru ADN, de obicei prin intercalare. Inițial s-a crezut că fluorocromii manifestă o afinitate deosebită pentru regiunile de ADN bogate în G—C. Studii recente demonstrează că porțiunile de ADN bogate în A—T tind să mărească fluorescența quinacrinei, în timp ce regiunile bogate în C—G tind s-o reducă.

Tehnica de lucru după Uchida și Lin (1973):

În 1973, Uchida și Lin evidențiază benzi Q pe lame cromozomiale proaspete, folosind quinacrină dihidroclorică în concentrație de 0,5%, la pH 4,5, ajustată cu HCl 0,1 N; pentru preparate mai vechi, pH-ul se ajustează corespunzător, de obicei sub 4,5.

— Lamele se imersionează în apă distilată, cîteva secunde.

— Se introduc în colorant pentru 15 minute.

— Se spală de trei ori în apă distilată (durata totală a spălării fiind de 10 minute).

— Se usucă la aer.

— Se montează într-o picătură de apă distilată, eliminîndu-se surplusul astfel ca stratul de apă să fie cît mai subțire posibil.

— Se examinează imediat cu rezultate foarte bune sau se țin la refrigerator și se examinează după 1—2 ore.

Tehnica de lucru după Zech (1969):

— Se folosesc preparate fixate în alcool etilic absolut — acid acetic (3 : 1) și uscate la aer.

— Se rehidratează lamele într-o serie de alcooli și apă distilată.

— Se imersionează în tampon fosfat (Sörensen sau Mac Ilvaine), la pH 4,1—7,0.

— Se colorează cu quinacrină dihidroclorică (5 mg/ml) sau cu quinacrină muștar (5 μg/ml), 20 minute.

— După colorare, lamele se spală de trei ori în tampon fosfat cu același pH ca la colorare. Se montează în tampon.

3.3.2. Metode de bandare C

Conferința de la Paris (1971) definește benzile C ca fiind acele benzi cromozomiale capabile să evidențiez eheterocromatina constitutivă, situată mai ales în regiunea centromerelor. Această definiție nu este adecvată pentru toate mamiferele. La bovine, de exemplu, regiunea centromerului rămîne aproape necolorată cînd se folosesc metode uzuale de evidențiere a heterocromatinei constitutive. Benzile C au fost evidențiate pentru prima oară de Pardue și Gall (1970), prin colorare cu soluție Giemsa a lamelor cu cromozomi de șoarece care fuseseră supuse unui tratament de denaturare a ADN. S-a observat o coloratie diferențiată a cromozomilor, cromatidele fiind slab colorate, iar regiunile pericentromerice și brațul lung al cromozomului Y foarte intens colorate. Ulterior s-au pus la punct o serie de tehnici (Arrighi și Hsu, 1971 ; Yunis și colab., 1971 ; Sumner, 1971 etc.), în care pretratamentul se realizează cu : soluții saline, soluții alcaline, uree, hidroxid de bariu etc.

Tehnica de lucru după Pardue și Gall (1970) :

— Preparatele cromozomiale se introduc într-o soluție de ribonuclează pancreatică A în 2 × SSC (0,3 M NaCl + 0,03 M citrat de sodiu, pH 7,0), în concentrație de 100 μg/ml, timp de 2 ore, la temperatura camerei.

— Se denaturează în 0,07 M NaOH, 3 minute, la temperatura camerei.

— Se incubează în 2 × SSC, 18 ore, la 65°C.

— Se colorează în soluție Giemsa (2 %) în tampon fosfat de sodiu 0,1M cu pH 6,8.

Tehnica de lucru după Arrighi și Hsu (1971) :

— Lamele cu preparate cromozomiale se introduc într-o soluție de HCl 0,2 M la temperatura camerei, 30 minute.

— Se clătesc de cîteva ori în apă distilată și se usucă la aer (de obicei 3 clătiri).

— Se tratează cu ribonuclează (100 μg/ml în 2 × SSC) într-o cameră umedă, la 37°C, 60 minute.

— Se clătesc de cîteva ori în 2 × SSC, etanol 70 %, etanol 95 % și se usucă la aer.

— Se introduc într-o soluție de NaOH 0,07N, 1 minut.

— Se clătesc în etanol 70 % și 95 %.

— Se incubează în 2 × SSC sau 6 × SSC, la 65°C, peste noapte.

— Se clătesc de cîteva ori în etanol 70 % și 95 %.

— Se colorează cu soluție Giemsa (50 ml apă distilată + 1,5 ml acid citric, se ajustează pH-ul la 6,8—7,2 cu Na_2HPO_4 0,2M + 1,5 alcool metilic absolut + 5 ml soluție Giemsa stoc), 15—30 minute.

— Se clătesc în apă distilată și se usucă la aer.

— Dacă preparatele au fost efectuate după tehnica squash, se montează în Permount.

Tehnica de lucru după Yunis (1971) :

— Preparatele cromozomiale se introduc în tampon fosfat 0,06 M, la pH 6,8, la 85—100°C, 10 minute.

— Se incubează în același tampon fosfat, la 65°C, cîteva ore (peste 10 ore cu rezultate bune).

— Se colorează cu una din soluțiile Giemsa tamponată pentru bandare.

Tehnica de lucru după Sumner (1971) :

— Se introduc preparatele cromozomiale în HCl 0,2 N, o oră, la temperatura camerei.

— Se clătesc în apă distilată.

— Se introduc în soluție apoasă de $Ba(OH)_2$ 0,5 % (preparată proaspăt), 5—15 minute, la 50°C.

— Se clătesc de cîteva ori în apă deionizată.

— Se incubează în 2 × SSC, la 60°C, o oră.

— Se clătesc repede în apă deionizată.

— Se colorează în soluție Giemsa (1 ml soluție Giemsa Gurr „R60" la 50 ml tampon, pH 6,8, preparat din tablete tampon Gurr), 1 1/2 ore.

— Se clătesc în apă deionizată și se usucă la aer.

Ulterior s-au elaborat o serie de variante ale tehnicilor originale, care constau în eliminarea unor etape sau în înlocuirea lor. Una dintre cele mai importante este tehnica lui Bobrow și colab. (1972) care, colorînd cromozomii cu o soluție Giemsa ajustată la pH 11 cu NaOH diluat, observă o coloratie roșie intensă a constricției secundare de pe cromozomul 9 (la om) și mai diminuată în regiunile heterocromatice (partea distală a cromozomului Y și brațele scurte ale cromozomilor acrocentrici).

Tehnica de lucru după Bobrow și colab. (1972) :

— Preparatele cromozomiale (vechi de 3—4 zile) se colorează 10—12 minute într-o soluție Giemsa preparată proaspăt (2 ml soluție Giemsa Gurr + 98 ml apă distilată ajustată la pH 11 cu NaOH). Se clătesc în apă distilată, se usucă, se trec în xilol și se montează.

Metodă de examinare simultană a benzilor C și T :

— Lamele se incubează într-o soluție saturată de $Ba(OH)_2$ cu pH 13,2 la 60°C, 40 minute.

— Se clătesc în apă distilată.

— Se introduc în 2 × SSC la 60°C, o oră.

— Se clătesc în apă distilată.

— Se colorează cu soluție Giemsa 10 % în tampon Sörensen (KH_2PO_4 1/15M + Na_2HOP_4 1/15M, pH 6,8), 2 minute, sau cu o soluție „SA" (bromură de 4,5, 4', 5'-dibenzo-3,3'-dietil-9-metil-tiocarbocianină) 0,005 %, într-un amestec de apă și formamidă în proporție de 1 : 1 cu pH 8,5.

Deoarece benzile C variază ca mărime de la un cromozom la altul și chiar în același cromozom, tehnicile de evidențiere a benzilor nu sînt folosite în identificarea cromozomilor. Ele pot fi însă foarte eficiente în

localizarea centromerilor la cromozomii meiotici sau în identificarea cromozomului Y la majoritatea mamiferelor. La unele specii, prin aplicarea tehnicilor de bandare C s-au evidenţiat şi benzi interstiţiale sau terminale. Acestea au apărut probabil prin inversiuni sau translocaţii în regiunea centromerică.

3.3.3. Metode de bandare G

Benzile G, ca şi benzile Q, caracterizează heterocromatina intercalară. Ambele tipuri de benzi au aceeaşi localizare, deşi există unele deosebiri, cum ar fi: colorația G-pozitivă a unor regiuni cromozomiale pericentromerice. Primele indicaţii privitoare la benzile G au fost furnizate în anul 1971 ca rezultat al modificării procedeelor de colorare a heterocromatinei.

Cu toate că posibilităţile de obţinere a acestor benzi sînt multiple, se conturează două tipuri mai importante de tehnici:

1) primul tip derivă din tehnicile lui Yunis şi colab. (1971), Sumner şi colab. (1971), care recomandă un tratament la cald într-o soluţie salină concentrată;

2) al doilea tip derivă din tehnica lui Dutrillaux şi colab. (1971) şi constă într-o digestie cu enzime proteolitice.

Tehnica ASG („Acetic-Salin-Giemsa") după Sumner (1971):

— Se identifică benzi G similare benzilor Q.

— Frotiurile cu cromozomi obţinute după tehnica uscării la aer se incubează în 2 × SSC la 60°C, o oră.

— Se clătesc în apă deionizată.

— Se colorează cu soluţie Giemsa (Giemsa Gurr „R 66" 1 ml + 50 ml tampon, pH 6,8, preparate cu tablete de tampon Gurr).

Tehnica Giemsa-9 după Patil (1971):

— Simpla modificare a pH-ului de la 6,8 la 9,0 produce benzi asemănătoare celor obţinute prin tehnica ASG.

— Preparatele cromozomiale obţinute după tehnica uscării la aer se încălzesc la 60°C, 90—120 secunde.

— Se colorează în soluţie Giemsa cu pH 9 (96 ml apă distilată + 2 ml 0,14 M Na_2HPO_4 + 2 ml soluţie Giemsa stoc; amestecul se ajustează la pH 9).

Durata tratamentului are o importanţă deosebită, deoarece după 1—2 minute se colorează preferenţial regiunile centromerice şi ocazional constricţiile secundare ale cromozomilor 1 şi 16. După 4—10 minute se obţin benzi similare benzilor Q, iar după 15—30 minute cromozomii se colorează uniform.

Tehnica de lucru după Utakoji (1972):

— Lamele se incubează 20—40 minute într-o soluţie rece de permanganat de potasiu 0,10 mM în tampon fosfat 33 mM, pH 7,0, conţinînd sulfat de magneziu 5 mM.

— Se spală în apă de robinet, 30 secunde; se trec în alcool etilic absolut, 5 minute, şi se usucă.

— Se colorează în soluţie Giemsa 10% în tampon fosfat, la pH 7,0, 5 minute.

— Se spală în apă distilată, se usucă, se trec în xilol şi se montează.

Tehnica de lucru după Shiraishi şi Yosida (1972):

— Se imersionează lamele într-un amestec de 3 părţi soluţie de uree 8 M şi o parte tampon Sörensen, cu pH 6,8, la 37°C, 10 minute.

— Se spală foarte bine în apă de robinet, pentru a îndepărta orice urmă de uree.

— Se colorează cu soluţie Giemsa diluată de 50—70 de ori cu tampon Sörensen, pH 6,8, la temperatura camerei, 5—20 minute.

Obţinerea de benzi G cu acid tricloracetic, acid percloric, Na-deoxiclorat, Na-laurilsarcosină şi uree:

— Se folosesc preparate cromozomiale obţinute după tehnica uscării la aer.

— Se incubează în sulfat de amoniu 0,6 M, 5 minute.

— Se spală de 3 ori în tampon fosfat Sörensen, pH 8,0.

— Se incubează într-o soluţie de acid tricloracetic (0,25%) în tampon Sörensen, pH 8,0, 10 minute, la 22°C.

— Se spală de 3 ori în tampon Sörensen, pH 8,0.

— Se colorează cu soluţie Giemsa, se usucă la aer şi se montează.

Benzi G de bună calitate s-au obţinut prin înlocuirea acidului tricloracetic cu acid percloric.

2) Metodele care implică o digestie enzimatică a preparatelor înainte de colorare prezintă avantajul obţinerii unor rezultate bune într-un timp scurt, uneori chiar pe lame de un an vechime.

Tehnica de lucru după Dutrillaux şi colab. (1971):

— Preparatele se obţin după tehnica uscării la aer în urma unei hipotonii de 15 minute într-un amestec de 15 părţi ser diluat cu 5 volume de apă distilată, o parte $MgCl_2$ 3,39% şi hialuronidază 2,5 U/ml. Prima fixare se realizează într-un amestec de cloroform (3 părţi), acid acetic glacial (1 parte) — etanol absolut (6 părţi), timp de 35 minute, iar a doua într-un amestec de etanol — acid acetic glacial (3 : 1), timp de 1—24 ore.

— Tratamentul cu pronază se realizează într-o soluţie de 5 g pronază în 100 ml apă distilată (0,005%), 3—6 minute, la 37°C.

— Lamele se clătesc în apă distilată şi se colorează cu soluţie Giemsa (o parte soluţie Giemsa, 9 părţi tampon fosfat la 1 l apă distilată), 20 minute sau mai mult.

Tehnica de lucru după Seabright (1971):

— Se introduc lamele (cu preparate obținute prin uscare la aer) într-o soluție de tripsină 0,25 % (soluție izotonică salină sau în apă distilată), 10—60 secunde, la temperatura camerei sau pînă la 37°C.

— Se colorează în colorant Leishman diluat cu tampon fosfat, pH 6,8, în proporție de 1 : 4.

— Se clătesc rapid în apă distilată, se usucă la aer, se trec în xilol și se montează.

Tehnica de lucru după Arrighi și Hsu (1971):

— Se folosește la mamifere, păsări și cîteva specii de pești.

— Se încălzesc lamele la 37°C, timp de o oră.

— Se face un tratament cu tripsină diluată 1 : 10 (soluție stoc 0,25 % diluată cu o soluție salină izotonică), 30 secunde — 2 minute, la temperatura camerei.

— Se clătesc în soluție salină fiziologică, apoi în etanol 95 % și se usucă la aer.

— Se colorează cu soluție Giemsa (2 %) în tampon fosfat, 4—10 minute.

— Se clătesc repede în apă deionizată și se usucă la aer. Nu este cazul să se monteze.

Tehnica de lucru după Sun și colab. (1973):

— Se usucă lamele la 60°C, 16—24 de ore.

— Se incubează în tampon fosfat 0,025 M la pH 6,8 (3,4 g KH_2PO_4 la 1 l apă distilată, ajustat la pH 6,8 cu NaOH concentrat), la 56°C, 10 minute.

— Se colorează cu soluție Giemsa + tripsină tamponată preparată proaspăt (73 ml tampon fosfat 0,025 M, pH 6,8 + 27 ml metanol + 50 mg Giemsa pudră + 0,3—0,4 ml tripsină 0,25 %), 15—20 minute.

— Se spală cu apă de robinet, se clătesc în apă distilată și se usucă; se trec în xilol și se montează.

Succesul obținerii benzilor G după tratamentul cu tripsină este influențat de o serie de factori:

— tipul preparatului: preparatele uscate la flacără sînt mai rezistente la tratament decît preparatele uscate la aer;

— vechimea lamelor: cu cît lamele sînt mai vechi cu atît celulele sînt mai rezistente la tratament. La lamele foarte vechi, o refixare în fixator Carnoy poate îmbunătăți calitatea benzilor;

— încălzirea lamelor la 37°C, timp de o oră;

— compoziția în săruri, concentrația, timpul de tratament și temperatura la care se realizează tratamentul cu tripsină au o importanță deosebită.

3.3.4. Metode de bandare R și T

Benzile R au fost denumite „benzi de reversie" deoarece sînt localizate în zonele în care alte tehnici de bandare nu produc benzi. Ele sînt pozitive la capetele cromatidelor, permițînd o analiză precisă a morfologiei cromozomilor, precum și identificarea aberațiilor structurale ce afectează frecvent telomerele. În 1973 Dutrillaux identifică benzile T pe care le caracterizează ca fiind o fracțiune a benzilor R localizate, în general, în porțiunea terminală a cromatidei.

Metodele pentru identificarea benzilor R și T nu sînt atît de numeroase ca cele pentru identificarea celorlalte tipuri de benzi.

Evidențierea benzilor R

Tehnica de lucru după Dutrillaux și Lejeune (1971):

— Se incubează preparatele cromozomiale (obținute după metoda pentru evidențierea benzilor G prin digestie enzimatică) în tampon fosfat, pH 6,5 (20 mM), la 87°C, 10—12 minute.

— Se clătesc în apă de robinet cîteva secunde.

— Se colorează cu soluție Giemsa (92 părți apă distilată + 4 părți tampon fosfat, pH 6,5, + 4 părți soluție Giemsa stoc), 10 minute.

— Se clătesc în apă distilată, se usucă, se trec în xilol și se montează.

Tehnica de lucru după Bobrow și colab. (1972):

— Se incubează lamele în tampon fosfat Sörensen, pH 6,5, la 85°C, 5—30 minute.

— Se colorează cu o soluție acridinorange 0,01 % în tampon Sörensen, pH 6,5, 5 minute.

— Se diferențiază în tampon Sörensen 2 minute, se montează într-un tampon, de obicei cel folosit la colorare, și se analizează la un microscop cu fluorescență.

Evidențierea benzilor T

Tehnica de lucru după Dutrillaux (1973):

Tehnica 1. Se introduc lamele într-un recipient care conține 94 ml apă distilată și 3 ml tampon fosfat, pH 6,7 (la 87°C), la care se adaugă 3 ml soluție Giemsa stoc cu cîteva minute înainte de introducerea lamelor. Durata tratamentului este de 5—30 minute.

— Se decolorează lamele, se rehidratează trecîndu-le succesiv prin băi de alcool cu concentrații regresive, se clătesc în apă distilată.

— Se recolorează cu o soluție de acridinorange în concentrație de 5 mg/100 ml tamponată, la pH 6,7, cu tampon fosfat, 20 minute.

— Se clătesc în tampon fosfat, se acoperă cu o lamelă și se examinează în lumină ultravioletă.

Tehnica 2. Lamele sînt supuse unei denaturări termice în soluție Earle sau tampon fosfat, 20—60 minute. Spre deosebire de tehnica precedentă, se folosește un pH mai acid (de exemplu, la 85°C pH 5,1). Se colorează fie cu soluție Giemsa, fie cu acridinorange ca în tehnica 1.

★

Cu ajutorul benzilor T se poate recunoaște cu precizie cromozomul 22 din complementul cromozomial uman. De asemenea, recunoașterea precisă a regiunilor telomerice permite analiza remanierilor cromozomiale structurale. Dutrillaux recomandă, în analiza cazurilor mai dificile ca: localizarea unei translocații, a unor complexe de translocații sau pentru identificarea cromozomilor individuali într-un complement cromozomial cu elemente foarte asemănătoare, utilizarea mai multor tehnici pentru studiul aceleiași metafaze.

1. Colorarea Giemsa, pentru observarea cromozomilor în forma lor clasică. Colorantul permite o bună conservare a lamelor, iar uleiul de imersie se înlătură ușor prin spălare în toluen.

2. Colorarea cu quinacrină mustar sau alți fluorocromi permite folosirea ulterioară a altor tehnici, deoarece fluorocromii se îndepărtează ușor de pe preparate prin clătire cu apă și alcool.

3. Se pot obține benzi G, după toate tehnicile, cu excepția celor care utilizează digestia enzimatică.

4. După benzi G (cu excepția celor care utilizează digestia enzimatică) se pot obține cu ușurință benzi R. Mult mai greu, dar nu imposibilă, este obținerea benzilor R după benzi C.

5. Cu rezultate foarte bune se pot obține benzi R după oricare din metodele enumerate anterior.

6. În sfîrșit, pot fi identificate benzile C. Uneori se poate observa coexistența benzilor C cu benzi T.

S-a observat că folosirea mai multor tehnici pentru analiza aceluiași preparat scade calitatea imaginii. Rezultate foarte bune s-au obținut cînd după colorare Giemsa s-au identificat benzile Q, apoi benzile R și T printr-un tratament la cald și colorare cu acridinorange.

3.3.5. Metode de bandare a cromozomilor meiotici

Vizualizarea heterocromatinei centromerice a bivalenților meiotici:

— Se introduc lamele cu preparate cromozomiale (squash sau uscate la aer) în HCl 0,2N, la temperatura camerei, 1 oră.

— Se clătesc în apă deionizată, se incubează în hidroxid de bariu 5%, la 50°C, 30 secunde.

— Se clătesc din nou în apă deionizată și se incubează în 2 × SSC, la 60°C, 1 oră.

— Se clătesc și se colorează cu soluție Giemsa (1 ml Giemsa Gurr „R-66" diluată cu 50 ml tampon Gurr la pH 6,8, o oră.

Tehnica de lucru după Klasterska și colab. (1976):

Prin modificarea tehnicii de bandare C au obținut rezultate foarte bune în studiul meiozei la *Mus musculus* și *Macaca mulatta*.

— Se introduc lamele într-o soluție saturată de hidroxid de bariu la temperatura camerei, 5 minute.

— Se spală în apă de robinet, 30 minute.

— Se incubează în 2 × SSC, la 65°C, două ore.

— Se colorează cu soluție Giemsa 15% în tampon Sörensen, la pH 6,8, 15—30 minute.

— Se spală în apă, se usucă la aer și se montează în euparal.

Tehnica de lucru în Laboratorul de genetică de la Universitatea din București:

— Se incubează frotiurile (obținute după metoda uscării la aer), la 65°C, 8 ore.

— Se răcesc la temperatura camerei și se introduc într-o soluție de tripsină (1 parte soluție de tripsină 0,25% în TFS + 9 părți TFS), la aproximativ 22°C, 3 minute.

— Se clătesc în TFS și se transferă rapid în două băi de alcool etilic 70%, respectiv 95%.

— Se usucă la aer și se colorează cu soluție Giemsa 4% în tampon fosfat 0,01 M.

La *sexul femel* s-au realizat puține studii privind comportarea cromozomilor în timpul meiozei, din cauza dificultăților de procurare a materialului biologic necesar studiului. La femeie, de exemplu, în decursul unui ciclu ovarian se maturează un singur folicul, iar șansa de a obține o diachineză, o metafază I sau II este foarte redusă.

Tehnica de lucru după Edwards (1965):

— Se studiază cromozomii meiotici umani prin maturarea *in vitro* a ovocitelor.

— Ovare sau părți din ovare obținute prin biopsie se introduc în mediu TC-199 stabilizat cu CO_2 5% la pH 7,2, și se lasă la temperatura camerei.

— Se disecă foliculii ovarieni și se înțeapă pentru a elibera ovocitele în mediul de cultură.

— După 25—36 de ore de incubație ovocitele se află fie în diachineză, fie în metafaza I, în timp ce figurile celei de-a doua diviziuni de maturație se obțin după 28—70 de ore de la incubație.

— Se trec ovocitele din mediul de cultură (cu o pipetă) într-o soluție hipotonă de citrat de sodiu 1%, la temperatura camerei, pentru 5—15 minute.

— O picătură de soluție hipotonă conținînd cîteva ovocite este pusă pe o lamă curată. Se adaugă 0,06 ml fixator și se obțin preparate uscate la aer care se colorează cu orceină lactoacetică, soluție apoasă de albastru de toluidină 2% sau soluție Giemsa.

3.3.6. Studiul structurii cromozomilor prin pretratament cu 5-bromdezoxiuridină, actinomicină D şi acridinorange

Pretratamentul cu 5-bromdezoxiuridină (5-BUdR) înainte de fixare oferă o serie de informaţii deosebit de importante pentru studiul cromozomilor ca: accentuarea constricţiilor secundare de pe cromozomii 1,9 şi 16 la om, identificarea cromozomului X heterocromatic la mamifere, obţinerea tuturor tipurilor de benzi, identificarea diferitelor tipuri de asimetrii cromatidiene.

Durata şi modul de administrare influenţează considerabil efectul tratamentului. Un pretratament continuu cu o durată totală de 3—15 ore produce pe cromozomi benzi R, modificînd toate sau numai o parte din benzile Q. Prin încorporarea 5-BUdR în ADN în timpul fazei S se poate stabili cronologia exactă a replicării diferitelor benzi cromozomiale.

După un tratament discontinuu de 5—11 ore, benzile R se modifică apărînd benzi Q sau G (depinde de colorație), însoţite de colorarea regiunilor centromerice. Se poate trage concluzia că benzile R se replică foarte devreme, în timp ce benzile Q au o replicaţie tardivă.

Cînd pretratamentul se realizează înainte cu 9—13 ore, în aceeaşi metafază cromozomul X eucromatic prezintă benzi R, iar cel heterocromatic benzi Q; aceasta înseamnă că spre mijlocul fazei S timpii de replicare pentru unele benzi R şi cei pentru unele benzi Q sînt foarte apropiaţi sau se suprapun.

După 17—24 de ore de pretratament apar asimetrii cromatidiene asociate cu benzi R. Astfel, una dintre cromatide apare normală, iar cealaltă alungită şi cu benzi R. În cazul în care pretratamentul se prelungeşte cromozomii devin vizibil asimetrici, iar benzile dispar. Cînd un pretratament discontinuu de 24 de ore cu 5-BUdR este urmat de un tratament de 36 de ore cu o doză concentrată de timidină apar asimetrii cromatidiene cu benzi Q pe cromatida mai scurtă.

Un pretratament dublu cu 5-BUdR (primul în concentraţie mică şi timp îndelungat, al doilea în concentraţie mare şi timp scurt) evidenţiază asimetrii cromatidiene cu benzi R pe ambele cromatide.

Pretratamentul cu actinomicină D şi acridinorange. Deşi este cunoscută proprietatea actinomicinei D de a induce mutaţii, s-a constatat că în doze mici (cîteva micrograme) produce zone de elongaţie pe cromozomi, asemănătoare acelora produse de 5-BUdR. Aceste zone sînt localizate la nivelul benzilor R, explicînd apariţia benzilor G.

Hsu (1973) a folosit acridinorange şi a observat că nu se modifică condensarea cromatidelor, dar se modifică calitatea colorării cu soluţie Giemsa. Astfel, benzile R devin foarte slab cromofile, iar benzile G îşi modifică colorația.

3.4. Metoda autoradiografică pentru studiul cromozomilor

Prin încorporarea timidinei tritiate în macromolecula de ADN, autoradiografia furnizează date preţioase privitoare la: replicarea cromozomilor, timpul şi locul de sinteză a acizilor nucleici în cromozomii mitotici şi meiotici, activitatea nucleolului şi a cromozomilor politenici. Cu ajutorul autoradiografiei s-a reuşit o caracterizare mai complexă a celor două forme sub care se găseşte materialul genetic în celulele eucariote, eu- şi heterocromatina etc.

Metoda se bazează pe proprietatea macromoleculei de ADN de a încorpora timidina tritiată în timpul fazei S. Radiaţiile emise de tritiul încorporat impresionează filmul sau emulsia aplicată pe lamă. Astfel, cromozomii sau regiunile cromozomiale care parcurg faza S în prezenţa materialului radioactiv apar marcaţi. Cromozomii sau segmentele cromozomiale care se replică devreme în timpul fazei S sînt primii care încorporează timidina ^3H şi, în consecinţă, primii care apar radioactivi. Cromozomii sau segmentele cromozomiale care se replică mai tîrziu nu reuşesc să încorporeze decît o cantitate mai mică de material radioactiv şi apar nemarcaţi. S-a constatat astfel că eucromatina se sintetizează timpuriu, iar heterocromatina se replică tardiv. Cu ajutorul autoradiografiei s-a demonstrat caracterul asincron al replicării cromozomilor umani, precum şi replicarea tardivă a unuia dintre cromozomii X în celulele provenite de la femelele normale de mamifere.

Studiul cromozomilor cu ajutorul autoradiografiei presupune 3 etape:

1. *Marcarea cu timidină tritiată*, care se realizează prin inocularea animalelor sau prin introducerea în mediul nutritiv al unei culturi celulare a unei soluţii de timidină tritiată în doze ce variază de la specie la specie, pentru o perioadă de timp variabilă, în funcţie de ciclul mitotic al fiecărui animal. Frecvent, se folosesc două metode.

Marcarea intermitentă (în pulsuri) constă în menţinerea timidinei tritiate în cultură o perioadă scurtă de timp (10—15 minute), după care se înlătură mediul cu timidină tritiată, cultura continuîndu-şi evoluţia într-un mediu nemarcat.

Marcarea continuă se foloseşte atît în culturi, dar mai ales *in vivo* şi se realizează prin introducerea izotopului radioactiv cu o anumită perioadă de timp înainte de prelucrarea culturilor sau de sacrificarea animalelor.

2. *Efectuarea preparatelor cromozomiale*, după tehnicile uzuale.

3. *Tehnica autoradiografică* localizează şi măsoară radioactivitatea cromozomilor cu ajutorul unor filme sau al unor emulsii fotografice aplicate peste preparat. Există o serie de tehnici. Astfel, Nachţigal şi colab. (1968) recomandă acoperirea preparatelor cromozomiale cu emulsie IFA EN_2. Înainte de folosire, gelul cu emulsie se încălzeşte la 37°C şi se diluează cu apă distilată în proporţie de 1 volum la 1,5 volume apă distilată. Pentru fiecare 1 ml emulsie nediluată se adaugă 0,5 ml adaos final (o soluţie de timol 3% în alcool — 50 cm^3 + 25 cm^3 glicerină + 25 cm^3 acetat de Cr 3%).

— Se imersionează lamele în emulsie sau se depune emulsia pe lamă cu ajutorul unei pipete astfel încît pe 1cm^3 de lamă să revină 0,01—0,015 ml soluţie diluată.

— Se usucă la 22 ± 2°C, în atmosferă lipsită de praf.

— Expunerea se realizează în cutii speciale, în care se evită atingerea sau contactul dintre lame, într-un spaţiu deshidratat cu $CaCl_2$, la 3—5°C.

— Se developează (după expirarea timpului de expunere) într-un revelator cu următoarea compoziție :

sulfit de sodiu anhidru	12 g
amidol (clorhidrat de 2,4-diaminofenol)	3 g
acid citric	1 g
bromură de potasiu	0,5 g
apă	1 000 ml

Developarea durează 1—5 minute, la 22°C.

— Se trec lamele într-o baie cu apă distilată rece, la 3—5°C, 1—2 minute.

— Se fixează în următorul fixator :

tiosulfat de sodiu	250 g
sulfit de sodiu anhidru	2 g
metabisulfit de potasiu 3%	10 ml
apă distilată	1 000 ml

— Se spală în apă distilată rece la 3—5°C.

Pentru o analiză mai completă se folosește tehnica dublei fotografieri care permite recunoașterea figurilor metafazice înainte și după îndepărtarea grăinurilor. De obicei, grainurile se îndepărtează după metoda Bianchi și colab. (1964).

— Se introduc lamele în apă distilată, 10 minute.

— Se trec în fericianură de potasiu 7,5%, 13 minute.

— Se introduc într-o soluție de tiosulfat de sodiu 20%, 3—5 minute.

— Se clătesc în 4 băi de apă distilată, cîte 1 minut de fiecare dată.

— Se introduc într-o soluție de tripsină 0,1% (tripsină 0,1 g + 50 cm^3 tampon 0,2 M, la pH 7 + 50 cm^3 apă), 10 minute, la 37°C.

— Se spală în apă de robinet, 5 minute.

— Se limpezesc în apă distilată și se usucă la aer.

Autoradiografia asociată cu metodele de bandare furnizează date privind modul de sinteză a ADN din fiecare cromozom și eventualele restructurări cromozomiale. Cele mai bune rezultate se obțin cînd ambele metode se aplică aceloraşi celule, cu condiția ca fiecare metodă să fie considerată ca o etapă independentă.

În cazul asocierii autoradiografiei cu metoda benzilor Q etapele pot fi următoarele (Gianelli, 1970) :

— preparatele cromozomiale se colorează cu quinacrină,

— se fotografiază la un microscop cu fluorescență,

— se spală pentru îndepărtarea fluorocromului,

— se acoperă cu film autoradiografic,

— se developează și se colorează cu Giemsa,

— se localizează metafazele pentru studiul modelului de marcaj.

Asocierea autoradiografiei cu metodele de bandare G este mai dificilă din cauza riscului de a se produce artefacte.

Pentru a etapiza aceste metode există mai multe posibilități : 1, preparatele colorate Giemsa se decolorează, se acopăr cu film sau emulsie, se developează și se recolorează cu Giemsa ; 2, preparatele sînt expuse procedeului autoradiografic și apoi colorate cu Giemsa (de regulă se obțin greu rezultate satisfăcătoare după postcolorare).

3.5. Metode pentru studiul cromozomilor sexului în nucleii interfazici

Investigarea cromozomilor în nucleii interfazici se poate realiza, în special în ceea ce privește heterozomii X și Y, datorită unor particularități ale acestora : heterocromatinizarea, heteropicnoza sau condensarea puternică. Unul dintre cei doi cromozomi X la femelele de mamifere este facultativ heterocromatic și printr-un proces de condensare devine vizibil în interfază, sub forma unui corpuscul X sau cromatină sexuală. Cromozomul Y este, de asemenea, heterocromatic și ușor identificabil în nucleii interfazici ca un corpuscul puternic fluorescent după colorație cu quinacrină sau întunecat după aplicarea metodelor de bandare G.

Studiul cromozomilor sexului în interfază oferă o serie de avantaje :

— Materialul de studiu se procură foarte ușor (mucoasă bucală, rădăcina firului de păr, celule sanguine) ;

— Se poate realiza în timp scurt la un număr mare de indivizi ;

— Dă indicații asupra anomaliilor cromozomilor sexului ;

— Dacă se realizează în nucleii celulelor provenite din lichidul amniotic poate constitui diagnosticul prenatal al sexului.

3.5.1. Evidențierea cromatinei X

Cromatina X (cromatina sexuală, corpusculul Barr) are următoarele caracteristici ; este prezentă în nucleii celulelor somatice provenite de la femei normale ; este o structură intens colorată cu diametrul de aproximativ 1 mμ, situată în majoritatea cazurilor la periferia membranei nucleare ; are o formă triunghiulară cu vîrful spre centrul nucleului, rectangulară sau emisferică. În celulele mucoasei bucale, incidența este relativ scăzută, de obicei 15%.

Tehnica evidențierii din mucoasa bucală :

— Se recoltează celulele prin raclarea mai profundă a mucoasei bucale cu o spatulă metalică.

— Se plasează celulele pe o lamă curată și cu ajutorul altei lame se realizează un frotiu în strat subțire.

— Fixarea, în cazul preparatelor temporare, se realizează concomitent cu colorarea în orceină lactoacetică (orceină 2% în acid acetic 45% care înainte de folosire se diluează cu un volum egal de acid lactic 70%). Se adaugă o picătură de orceină lactoacetică peste celule, se pune lamela și se lasă 20—30 minute la temperatura camerei. Se elimină surplusul de colorant prin presare ușoară cu hîrtie de filtru. În cazul preparatelor permanente, fixarea se realizează în alcool etilic 95—96%, 30 minute. După fixare urmează o deshidratare într-o serie de alcooli și hidroliză în HCl 5 N la temperatura camerei, 25 minute, după care se colorează.

— Colorarea se poate realiza cu diverși coloranți :

1. *Cresyl violet* (Moore și Barr, 1955)

— Lamele se clătesc de două ori în apă distilată.

— Se imersionează într-o soluție apoasă de cresyl violet 1%, 45 secunde, sau în soluție de 0,5%, 8 minute.
— Urmează o nouă clătire a lamelor în apă distilată.
— Se trec apoi succesiv în alcool etilic 95%, alcool absolut de două ori, alcool + xilol (1 : 1) de două ori și xilol de două ori.
— Se montează în balsam de Canada.

2. *Tionină* (Klinger și Ludwing, 1957)
— Lamele se clătesc de cîteva ori în apă distilată.
— Colorarea se face într-o soluție de tionină tamponată la pH 7,5, 15 minute. Soluția de tionină se prepară astfel: 28 ml soluție tampon (acetat de sodiu 9,714 g + barbiturat de sodiu 14,714 g, ajustat cu apă dublu distilată pînă la 500 ml), 32 ml HCl 1/10 N și 40 ml tionină saturată (20 g tionină în 500 ml alcool 50%) filtrată.
— Clătire în apă distilată, deshidratare și montare.

3. *Feulgen*
— După hidroliză, fără clătire, preparatele se trec direct în colorant; colorarea se realizează la întuneric cu o soluție Feulgen.
— Fiecare lamă se clătește în apă de robinet de două ori cîte 30 de minute.
— Se deshidratează rapid în băi succesive de alcool și xilol. Se montează în balsam de Canada.

Tehnica evidențierii din rădăcina firului de păr (după Schmidt, 1967):

— Se taie firul de păr la 2 cm distanță de rădăcină, se plasează pe o lamă, se secționează rădăcina și se acoperă cu o soluție de orceină acetică în apă acetică.
— Se transferă într-o picătură de acid acetic 50%.
— Se trece din nou într-o picătură de orceină acetică și se acoperă cu o lamelă.
— Se încălzește ușor și se lasă 5 minute; se elimină surplusul de colorant prin presare ușoară cu hîrtie de filtru deasupra lamelei.

3.5.2. Evidențierea drumstick-ului

Davidson și Smith (1954), cercetînd pe celulele din sîngele periferic la om, au descoperit drumstick-urile, formațiuni de tipul bățului de tobă, prezente într-un procent relativ scăzut în leucocitele polimorfonucleare provenite de la femei normale și absente în același tip de celule provenite de la masculi normali. Mittwoch (1967) a identificat drumstick-uri în celulele mai multor specii de mamifere. Acest corpuscul cromatic are un diametru de 1,5 mμ și este atașat de restul nucleului printr-un filament în; apare în aproximativ 3% din neutrofilele normale.

Tehnica de lucru:

— Se realizează frotiuri de sînge periferic și se usucă la aer.
— Se fixează în alcool metilic absolut, 10 minute.

— Se colorează într-o soluție May Grünwald diluată în părți egale cu apă distilată tamponată la pH 6,8, 5 minute, apoi într-o soluție Giemsa diluată cu apă tamponată de 14 ori volumul ei, 20 minute.

Deoarece incidența drumstick-urilor este scăzută, se recomandă examinarea a cel puțin 500 de neutrofile.

3.5.3. Evidențierea cromatinei Y

Cromatina Y, deși descrisă cu aproximativ 30 de ani în urmă, a fost observată în nucleii interfazici abia în 1970 prin adaptarea tehnicii originale a lui Caspersson. La bărbați normali s-a identificat un corpuscul mic, fluorescent, iar la subiecți cu $2n = 47$ și formula heterozomală XYY, 2 corpusculi. Fiecare corpuscul Y corespunde brațului distal al cromozomului Y. Numărul corpusculilor Y este egal cu numărul cromozomilor Y. Are forma unei pete fluorescente, cu diametrul de 0,25 mμ. Poate fi identificată în nucleii celulelor din mucoasa bucală, limfocite și fibroblaste, rădăcina firului de păr, spermatozoizi și celulele amniotice.

Tehnica de lucru după Schwinger (1971):

— Se introduce rădăcina firului de păr în acid acetic 25%, 1—2 minute, apoi este trecută ușor pe suprafața unei lame curate, încît să rămînă suficiente celule aderente la lamă (aceeași rădăcină poate fi folosită pentru mai multe preparate).
— Preparatul se usucă la aer și se colorează.

Tehnica de lucru după Mittwoch (1974):

— Preparatele se fixează în metanol, metanol — acid acetic (3 : 1) sau etanol — eter (1 : 1), 3 minute — cîteva ore.
— Se imersionează într-o soluție apoasă de quinacrină dihidroclorică, 5 minute; se spală în apă de robinet și se clătesc în apă distilată în care s-a dizolvat o tabletă tampon Gurr (pH 5,5).
— Se montează în apă cu pH 5,5 plus o cantitate egală de glicerină și se examinează la microscopul cu fluorescență cu iluminare verticală.

4 | Cariotipul și standardizarea sa

Analiza cromozomială se impune nu numai pentru cercetările de genetică, ci și pentru cele de taxonomie și filogenie. Creșterea apreciabilă a lucrărilor de citogenetică în ultimii ani a făcut necesară standardizarea modului de înregistrare a datelor sau notațiilor folosite. De pildă, standardizarea indicilor de studiu ai cromozomilor umani a fost elaborată în cadrul a patru conferințe internaționale care s-au întrunit la Denver (1960), Londra (1963), Chicago (1966) și Paris (1971).

La conferința de la Denver, termenul de cariotip a fost definit astfel: „o aranjare sistematică a cromozomilor unei singure celule, preparați prin desenare sau fotografiere, în înțelesul lărgit conform căruia cromozomii unei singure celule pot reprezenta cromozomii unui individ sau chiar ai unei specii" iar termenul de idiogramă ca: „reprezentarea diagramatică a unui cariotip, care se bazează pe măsurători de cromozomi din cîteva sau mai multe celule". O definiție mai amănunțită a cariotipului este cea dată de Hughes (1966): „Prin cariotip se înțelege o aranjare sistematizată a cromozomilor unei celule mitotice sau meiotice, implicînd numărul, forma, mărimea sau orice altă caracteristică care poate fi reprezentativă pentru complementul cromozomial al unei varietăți celulare, individ sau specie".

4.1. Identificarea cromozomilor și alcătuirea cariotipului

Stadiul de diviziune cel mai adecvat analizei cariotipului este metafaza mitotică, cînd cromozomii prezintă maximul de condensare și colorabilitate.

Procedeul cel mai larg folosit în studiul cromozomilor metafazici este acela al măsurătorilor. Se măsoară de obicei lungimea integrală a cromozomului, lungimea brațelor, poziția constricțiilor secundare în raport cu cea a centromerului etc. Aceste criterii nu permit întotdeauna o identificare precisă a cromozomilor. Dificultățile țin, mai ales, de existența unor fluctuații care pot masca considerabil diferențele reale dintre cromozomi. Astfel, la fluctuațiile strict biologice se pot adăuga: eroarea personală, care provine din imprecizia măsurătorilor, eroarea optică, heteropicnoza unor regiuni cromozomiale sau a unor cromozomi întregi (cromozomii sexului de pildă), gradul de întindere a regiunii centromerice, momentul metafazic pe baza căruia se efectuează analiza etc. Se știe, de pildă, că cromozomii mari ating maximul de contractare în stadiile mai avansate ale metafazei, în timp ce cromozomii mici ating acest nivel în stadii mai timpurii. De aceea, această metodă a fost contestată de Patau (1965), care o consideră inutilă. Cu toate acestea, ea a rămas pînă în prezent una din metodele de bază pentru identificarea cromozomilor.

Majoritatea măsurătorilor cromozomiale s-au făcut pe cromozomi umani. În caracterizarea acestora, conferința de la Denver a adoptat următorii 3 parametri:

1. Lungimea fiecărui cromozom raportată la lungimea totală a unui complement haploid normal (suma lungimilor celor 22 autozomi și a unui cromozom X) exprimată la 1 000.

2. Raportul brațelor cromozomiale exprimat prin raportul dintre brațul lung și brațul scurt (braț lung/braț scurt).

3. Indexul centromeric exprimat prin raportul dintre brațul scurt și lungimea totală a cromozomului, raportat la 100 (braț scurt/cromozom × 100).

În afara acestor parametri, Patau (1965) recomandă reprezentarea cromozomilor sub formă de puncte într-un sistem de coordonate în care se notează pe abcisă lungimea brațului lung, iar pe ordonată lungimea brațului scurt, ambele exprimate în procente din lungimea totală a complementului cromozomial haploid. Această distribuție de puncte a fost numită *cariogramă*. Prin obținerea unui tip asemănător de apropiere între punctele unor perechi de cromozomi în cariograme efectuate din diferite celule se poate stabili omologia cromozomilor respectivi.

Pentru elaborarea unui cariotip prima condiție este identificarea morfologică a cromozomilor. Pentru definirea poziției centromerului și a diferitelor tipuri morfologice de cromozomi care rezultă din această localizare se recomandă nomenclatura propusă de Levan și colab. (1964).

Poziția centromerului, una dintre caracteristicile cele mai constante ale cromozomilor (tabelul nr. 14), poate fi exprimată prin relațiile:

$$d = l - s; \text{ sau } r = \frac{l}{s}$$

în care: l și s = lungimea brațului lung, respectiv a celui scurt;
d = diferența dintre brațul lung și brațul scurt;
r = raportul dintre brațe.

Dacă se cunosc lungimea cromozomului și indicele centromeric se poate calcula lungimea brațului lung conform relației:

$$l = \frac{c\,(100 - i)}{100}$$

în care: c = lungimea cromozomului, iar i = indicele centromeric.

Tabelul nr. 14

Tipurile de cromozomi după poziția centromerului (după Levan și colab., 1964)

Simboluri	Localizare	Valoarea lui d	Valoarea lui r
		0	
M	punct median	0 — 2,5	1,0
m	regiune mediană	2,5— 5,0	1,0—1,7
sm	regiune submediană	5,0— 7,5	1,7—3,0
st	regiune subterminală	7,5—10,0	3,0—7,0
t	regiune terminală	10,0	7,0—∞
T	punct terminal		∞

În raport cu cele 4 regiuni aproximativ egale în care este împărțit fiecare braț al cromozomului, se propune următoarea nomenclatură standardizată (tabelul nr. 15).

— cromozomi metacentrici, cu centromerul situat în punctul median (M) sau în regiunea mediană (m).

— cromozomi telocentrici, cu centromer terminal (T).

— cromozomi acrocentrici, cu centromerul în regiunea terminală (t).

— cromozomi submetacentrici și subtelocentrici, cu centromerul situat în regiunea submediană (sm), respectiv subterminală (st).

Tabelul nr. 15

Nomenclatura cromozomilor pe baza poziției centromerului (după Levan și colab., 1964)

Poziția centromerului	Nomenclatura cromozomială	Indexul centrometric	Raportul brațelor	Echivalarea cu nomenclatura citogenetică curentă
Median „sensu stricto"	M	50,0	1,0	Metacentric
Regiunea mediană	m	37,5	1,7	„
Submedian	sm	25,0	3,0	Submetacentric
Subterminal	st	12,5	7,0	Subtelocentric
Regiunea terminală	t	6,25	—	Acrocentric
Terminal „sensu stricto"	T	0,0	—	Telocentric

Alcătuirea unui cariotip, indiferent de materialul din care sînt efectuate preparatele, necesită mai multe etape.

1) *Etapa prelucrării microscopice*, constînd în alegerea sistematică a metafazelor ce urmează a fi analizate. Două criterii sînt esențiale în alegerea metafazelor utilizabile: să nu existe suprapuneri de cromozomi sau, dacă sînt, numărul lor să fie cît mai mic și să nu intereseze mai mult de 2 cromozomi; cromozomii să nu fie împrăștiați pe o suprafață prea mare, caz în care ei ar putea proveni de la două sau mai multe celule.

Metafazele care corespund analizei citogenetice trebuie localizate pe lame, deoarece la prepararea cariotipului confruntarea dintre copia fotografică și imaginea directă a preparatului este indispensabilă. Localizarea se poate face prin diferite procedee, dintre care cele mai uzuale sînt:

notarea exactă a celor două vernieré de pe platina microscopului și punctarea cu tuș (punctul nu trebuie să acopere alte metafaze și în nici un caz pe aceea pe care o indică).

2) *Studiul cromozomilor* se face cu mărirea maximă pe care o poate oferi microscopul cu care se lucrează, implicînd: a) numărarea de cromozomi, b) identificarea morfologică a cromozomilor, c) identificarea aberațiilor cromozomiale.

Numărarea de cromozomi este de mare importanță deoarece este prima caracteristică citogenetică a populației celulare examinate. Numărarea se poate face direct în placa metafazică, delimitînd eventual anumite regiuni, dar mai corectă și de mai mare precizie după desen. Desenarea mitozelor se poate face fie prin procedeul clasic, care folosește camera clară, fie prin simpla schițare a cromozomilor pe o coală de hîrtie. Primul procedeu are avantajul că reproduce fidel dispoziția și morfologia cromozomilor. Pe desen se notează indicativele materialului celular, numărul lamei și localizarea pe lamă a mitozei, numărul total de cromozomi și orice observație citogenetică.

Identificarea cromozomilor aparținînd la diferite grupe, de exemplu, cromozomii din grupele D sau G ai cariotipului uman, cromozomii din grupele M sau S la *Vicia faba*. Numărul acestor cromozomi se notează pe desenul mitozei.

Identificarea aberațiilor cromozomiale, a căror prezență se notează, de asemenea, pe desenul mitozei examinate, precizîndu-se tipul de aberație, localizarea pe cromozom etc. Cînd se urmărește efectul citogenetic al unui agent fizic, chimic sau biologic (radiații ionizante, substanțe chimice mutagene, virusuri), înregistrarea aberațiilor reprezintă obiectivul central al analizei cromozomilor.

3) *Etapa prelucrării fotografice a metafazelor corespunzătoare*. De calitatea copiilor fotografice depinde întreaga muncă de prelucrare ulterioară a cariotipurilor. Numărul metafazelor fotografiate depinde de cerințele studiului citogenetic și de posibilitățile de lucru ale laboratorului. Este de dorit ca numărul acestora să fie cît mai mare, dar un minim de 10% din numărul mitozelor examinate este absolut necesar. Pentru fotografiere se aleg numai metafazele extrem de clare. După aceea, cromozomii sînt decupați și aranjați în cariotip. Se recomandă ca alcătuirea cariotipului să se desfășoare pe baza a cel puțin două copii fotografice ale metafazei, desenului și imaginii microscopice însăși a metafazei, luată cu un obiectiv cu imersie. Pe baza acestor materiale se verifică încă o dată toate particularitățile metafazei respective. Decuparea cromozomilor se face cu atenție, tăind cu foarfeca fiecare cromozom în parte și lăsînd întotdeauna o margine albă în jurul imaginii fotografice negre.

Aranjarea cromozomilor în cariotip trebuie să pornească de la cunoașterea cariotipului normal al speciei. Fac excepție de la această regulă studiile care urmăresc stabilirea cariotipului unei anumite populații celulare sau al unor specii nestudiate încă.

Primul criteriu de aranjare a cromozomilor în cariotip este cel al lungimii, cromozomii fiind dispuși în ordine descrescătoare. Se măsoară, de obicei, ambele cromatide de-a lungul axelor lor individuale și se face o medie a rezultatelor. Regiunea centromerică se include în măsurătoare, iar sateliții nu se măsoară.

Al doilea criteriu este acela al dispunerii pe grupe morfologice. Cariotipurile normale au adesea perechile de cromozomi aranjate pe grupe morfologice care se notează cu litere mari în ordine alfabetică sau cu cifre. Aceste grupe cuprind două sau mai multe perechi de cromozomi care se identifică greu sau deloc prin mijloacele uzuale ale analizei citogenetice.

Al treilea criteriu este acela al împerecherii cromozomilor omologi. Plecînd de la premisa că omologia genetică corespunde unei omologii morfologice, cromozomii presupuşi omologi sînt dispuşi în perechi sau grupe în funcţie de gradul de poliploidie al celulei respective (diploid, triploid, tetraploid etc.). Aranjarea cromozomilor pe perechi, notate de obicei cu numere în cadrul cariotipului normal, presupune folosirea a cel puţin doi parametri de caracterizare a cromozomilor respectivi: lungimea şi raportul braţelor. Împerecherea cromozomilor omologi, prin simpla observare vizuală, se poate realiza, ţinîndu-se seama de anumite condiţii:

a) se pot împerechea cu mai multă precizie cromozomii dintr-o metafază mai puţin avansată, cu braţele puţin contractate;

b) pentru împerecherea cromozomilor din cadrul unei grupe morfologice primul criteriu este raportul braţelor, nu cel al lungimii;

c) la cromozomii mici, împerecherea pe criteriul raportului braţelor este relativă, deoarece diferenţele dintre măsurători la acest indice sînt mici.

Căutarea unor criterii morfologice utile pentru recunoaşterea cromozomilor a dus la constatarea că identificarea unor constricţii secundare pe anumiţi cromozomi este de un real folos. Constricţiile secundare sînt dispuse în regiuni cromozomiale diferite ca structură şi funcţie, cum sînt regiunile care delimitează sateliţii de restul cromozomului (regiunea organizatorului nucleolar), sau interstiţial pe braţele cromozomului. Deşi se pot observa şi pe preparate efectuate prin metode uzuale, frecvenţa şi intensitatea constricţiilor secundare cresc sub influenţa unor agenţi fizici, chimici şi biologici ca: hidrazida maleică, 5-bromdezoxiuridina, virusul SV40, în mediu de cultură lipsit de calciu şi la temperatură scăzută.

După anul 1970, datorită perfecţionării tehnicilor de bandare a fost posibilă identificarea cu certitudine a fiecărui cromozom din cariotipul uman şi din cariotipul speciilor de animale şi plante mai frecvent folosite în cercetările de citogenetică. Fiecare pereche de cromozomi prezintă un model caracteristic de benzi, care ocupă aceeaşi poziţie, au aceeaşi grosime şi aceeaşi intensitate a fluorescenţei (benzile Q) sau de colorare.

4.2. Cariotipul uman normal

Cariotipul uman este reprezentat prin 7 grupe distincte de cromozomi autozomali, aranjaţi în ordine descrescătoare şi numerotaţi de la 1 la 22, şi o pereche de cromozomi sexuali XY la bărbaţi şi XX la femei. Cromozomii sînt aranjaţi după mărime şi în cadrul aceluiaşi grup. Identificarea cromozomilor din aceste grupe nu este totdeauna simplă. De pildă, în grupul 6—12, care include şi cromozonul X, identificarea este destul de dificilă din cauza similitudinii cromozomilor; există totuşi posibilitatea de

a distinge cromozomul X şi perechea 6 de restul grupei. Grupele sînt notate cu cifre sau cu litere de la A la G (fig. 9).

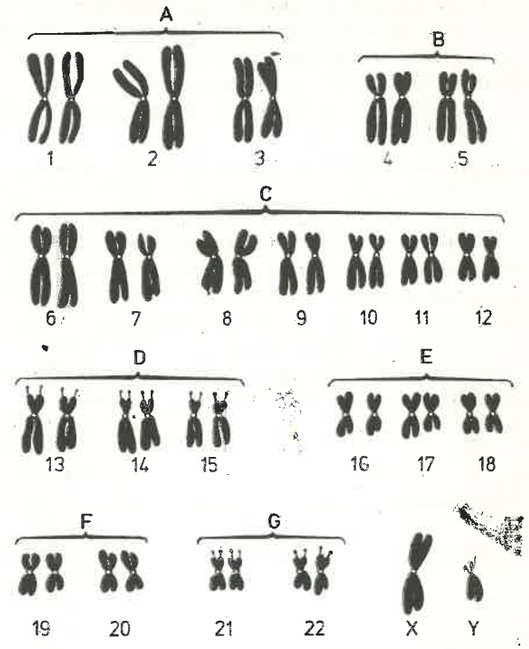


Fig. 9. — Grupele de cromozomi umani; heterozomii sînt notaţi cu X şi Y.

4 2.1. Caracterizarea generală a cromozomilor mitotici umani

Grupul 1—3 (A): Cromozomi mari cu centromeri aproximativ mediani, care se pot deosebi uşor între ei prin mărimea şi poziţia centromerului. În multe celule, cromozomul 1 are o constricţie secundară în regiunea proximală a braţului lung. Segmentul distal al celuilalt braţ termină sinteza ADN înaintea celorlalţi cromozomi.

Grupul 4—5 (B): Cromozomi mari cu centromeri submediani. Se deosebesc cu dificultate între ei. Braţele lungi ale cromozomilor din perechea 4 termină sinteza ADN mai tîrziu decît braţele lungi ale cromozomilor perechii 5. Braţele scurte ale perechii 5, în mod caracteristic, au o sinteză tardivă de ADN.

Grupul 6—12 şi cromozomul X (C): Cromozomi de mărime medie cu centromeri submediani. Dintre aceştia, patru sînt metacentrici (numerotaţi 6, 7, 8 şi 11), iar trei sînt submetacentrici (9, 10 şi 12). În celulele femele normale, un cromozom încorporează timidină marcată în cea mai mare parte a lungimii sale, mai tîrziu decît ceilalţi cromozomi ai acestui grup. Acesta este considerat a fi un cromozom X.

Grupul 13—15 (D): Cromozomi de mărime medie cu centromeri aproape terminali (acrocentrici), toţi avînd sateliţi. Perechea 13 continuă sinteza de ADN relativ tîrziu pe segmentele întinse ale braţelor lungi, iar perechea 15 termină sinteza în general foarte timpuriu.

Grupul 16—18 (E): Cromozomi mici cu centromer aproape median (la cromozomul 16) sau submedian. Cromozomul 16 are o constricție secundară pe porțiunea proximală a brațului lung. Cromozomul 17 este de obicei mai lung și termină sinteza de ADN mai devreme decît cromozomii perechii 18.

Grupul 19—20 (F): Cromozomi scurți cu centromeri aproximativ mediani. Ambele perechi termină sinteza de ADN timpuriu și nu pot fi deosebiți între ei.

Grupul 21—22 și cromozomul Y (G): Cromozomi acrocentrici foarte scurți. Cromozomii 21 și 22 au sateliți. Cromozomul Y este asemănător cu acești cromozomi, fiind de obicei mai mare decît ei, are o replicare relativ tardivă comparativ cu a celorlalți cromozomi din acest grup.

Conferința de la Londra consideră drept caracteristici importante ale cromozomilor constricțiile secundare și modul diferențiat de încorporare a timidinei marcate radioactiv, demonstrabil prin autoradiografie.

Pentru descrierea garniturii cromozomiale umane, conferința de la Chicago (1966) propune folosirea unor simboluri care permit o înțelegere ușoară, scrisă și codificată, a acesteia:

A—G	grupele de cromozomi
1—22	numerele autozomilor
X, Y	cromozomii sexului
diagonala (/)	separă liniile celulare la descrierea mozaicismelor
semnul plus (+) sau minus (—)	așezat după desemnarea numărului de autozomi sau a literei de grup indică faptul că acel cromozom este în plus sau lipsește
semnul interogativ (?)	indică o identificare discutabilă a cromozomului sau structurii cromozomiale
ace	acentric
cen	centromer
dic	dicentric
end	endoreduplicație
h	constricție secundară sau regiune cu colorație negativă
i	izocromozom
inv	inversiune
mar	cromozom marker
mat	origine maternă
pat	origine paternă
p	brațul scurt al cromozomului
q	brațul lung al cromozomului
r	cromozom inelar
t	translocație
tri	tricentric
s	satelit
simboluri repetate	duplicare de structură cromozomială

Conferința de la Chicago completează această listă cu noi simboluri folosite în aberațiile numerice și structurale ale cromozomilor.

În descrierea unor cariotipuri anormale primul fapt care se înregistrează este numărul total de cromozomi, inclusiv cromozomii sexului. De exemplu:

45, X = 45 cromozomi, 1 cromozom sexual X
47, XXY = 47 cromozomi, cromozomi sexuali XXY.

Dacă există o aberație numerică a autozomilor, litera grupului din care face parte cromozomul suplimentar sau absent este urmată de semnul plus sau minus. De exemplu:

45, XX, C— = 45 cromozomi, cromozomi sexuali XX, 1 cromozom lipsă în grupul C.
48, XXY, G+ = 48 cromozomi, cromozomi sexuali XXY, 1 cromozom din grupul G suplimentar.

La conferința de la Paris (1971) s-au recomandat noi simboluri:

del	deleție
der	cromozom derivat
ins	inserție
inv, ins	inserție inversată
rcp	translocație reciprocă
rec	cromozom recombinat
rob	translocație robertsoniană
tan	translocație în tandem
ter	terminal (pter = capătul brațelor scurte, qter = capătul brațelor lungi)
,, :''	ruptură fără reunire
,, : :''	ruptură și reunire
→	de la — la.

4.2.2. Modele de bandare a cromozomilor umani

Sistemul de nomenclatură standardizat cu prilejul Conferinței de la Paris (1971) propune următoarele:

1. Cromozomii rămîn clasificați conform criteriilor stabilite anterior, noul sistem permițînd recunoașterea tuturor perechilor de cromozomi în funcție de modelul de benzi și nu numai în funcție de lungime și de indicele centromeric.
2. S-au definit noțiuni noi: reperul și regiunea. Reperul este orice caracter morfologic care permite identificarea unui cromozom: centromerul, capetele brațelor cromozomiale, anumite benzi. Regiunea este o zonă cromozomială cuprinsă între doi reperi adiacenți.

Astfel fiecare cromozom este alcătuit din brațul scurt (p) și brațul lung (q) împărțite în regiuni, avînd ca reper benzile, numerotate cu cifre arabe și de la centromer spre telomere. La unii cromozomi au fost distinse și subbenzi care au fost de asemenea numerotate. Specificarea unui punct de pe cromozom se realizează prin înscrierea unor simboluri care reprezintă în ordine — numărul cromozomului, simbolul brațului, numărul regiunii, numărul benzii și eventual al subbenzii. De exemplu: 2 q 3 1 înseamnă cromozomul 2, brațul lung, regiunea 3, banda 1.

Caspersson și colab. (1969, 1970) au descris detaliat modelul de **benzi Q** caracteristic fiecărui cromozom uman (fig. 10):

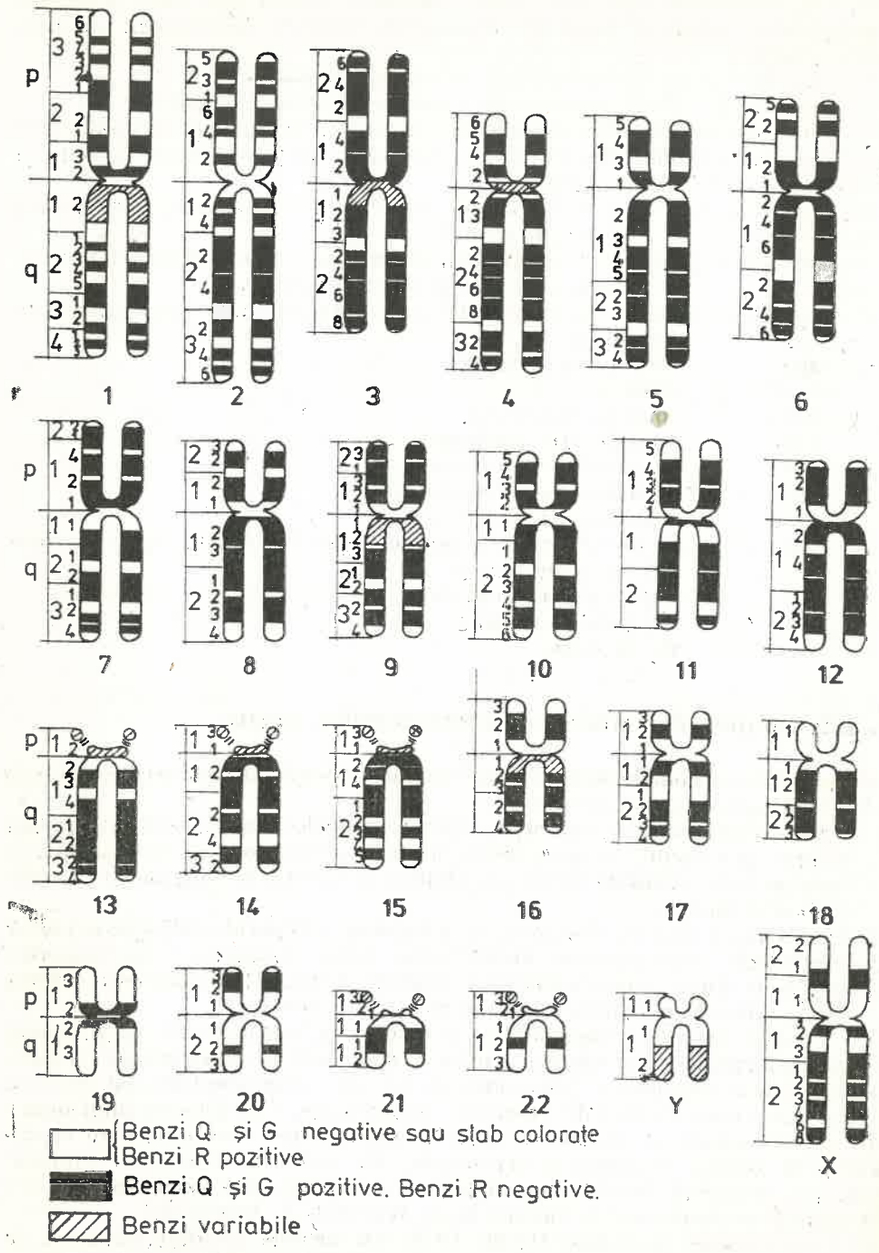


Fig. 10. — Modelul de benzi Q, G și R ale cromozomilor umani; centromerii sînt reprezentați numai după coloraţia Q (după Maximilian și Ionescu, 1978).

Cromozomul 1 are pe braţele scurte două benzi luminoase în zona din apropierea centromerului, iar între centromer și această zonă se observă o mică bandă întunecată. Pe braţele lungi are o bandă mediană luminoasă și una în partea distală.

Cromozomul 2 are pe ambele braţe o fluorescenţă relativ uniformă. În regiunea mijlocie a braţelor se disting totuși două benzi.

Cromozomul 3 are pe ambele braţe, de o parte și de alta a centromerului, cîte o bandă intens fluorescentă, care pare a fi un caracter individual ereditar; uneori numai unul din cei doi omologi are această bandă. Regiunile distale ale ambelor braţe sînt ușor fluorescente.

Cromozomul 4 poate fi deosebit de cromozomul 5 prin aceea că braţele lungi au o zonă luminoasă lîngă centromer și 4 benzi moderate fluorescente. Zona luminoasă din apropierea centromerului nu se observă niciodată pe cromozomul 5.

Cromozomul 5 se caracterizează prin prezenţa în zona mijlocie a braţelor lungi a unei benzi intens fluorescente, iar în zona terminală a unei benzi mai puţin fluorescente.

Cromozomul 6 are pe braţele scurte două benzi separate de o zonă întunecată. Braţele lungi sînt omogen fluorescente.

Cromozomul 7 are pe braţele lungi două benzi luminoase și încă două benzi în regiunea terminală.

Cromozomul 8 este relativ greu de identificat. Caspersson și colab. (1970) recomandă identificarea acestui cromozom pe criterii morfologice și prin eliminare. Uneori, pe imagini foarte bune, se observă două benzi luminoase pe braţele lungi.

Cromozomul 9 are o constricţie lîngă centromer pe braţele lungi și două benzi luminoase.

Cromozomul 10 se caracterizează prin prezenţa pe braţele lungi a unei benzi luminoase și două benzi mai puţin luminoase.

Cromozomul 11 are pe braţele lungi în apropierea centromerului o bandă intens fluorescentă care, uneori, este separată de centromer printr-o constricţie secundară.

Cromozomul 12 poate fi deosebit de cromozomul 11 prin indicele centromeric și prin faptul că segmentul distal este relativ întunecat.

Cromozomul X este greu de identificat prin fluorescenţă. Pe imagini foarte bune se observă o bandă mică pe braţele scurte și o bandă lată pe braţele lungi, între aceasta și centromer se află o regiune nefluorescentă. Este greu de deosebit de cromozomul 10.

Cromozomul 13 posedă pe braţele lungi două benzi fluorescente separate de centromer printr-o regiune mai puţin fluorescentă. Pe braţele scurte se observă o bandă intens fluorescentă.

Cromozomul 14 are pe braţele lungi o bandă lată intens fluorescentă lîngă centromer și o bandă îngustă în regiunea terminală.

Cromozomul 15 se deosebește de cromozomul 14 printr-o bandă mică fluorescentă pe braţele mici și prin absenţa bandei din regiunea terminală a braţelor lungi.

Cromozomul 16 se caracterizează prin existenţa unei benzi intens fluorescente în porţiunea distală a braţelor.

Cromozomul 17 are pe braţele lungi două benzi, una mai îngustă lîngă centromer şi una mai lată distal.

Cromozomul 18 are două benzi de luminozitate egală pe braţele lungi.

Cromozomul 19 are două benzi de o parte şi de alta a centromerului. În general este slab fluorescent.

Cromozomul 20 se caracterizează printr-o fluorescenţă intensă a braţelor scurte.

Cromozomii 21 şi 22 se deosebesc relativ greu unul de celălalt. Cromozomul 21 prezintă o fluorescenţă mai intensă decît 22.

Cromozomul Y este intens fluorescent îndeosebi în jumătatea distală a braţelor lungi. Uneori s-au observat şi cromozomi Y nefluorescenţi.

Benzile G sînt similare celor obţinute prin fluorescenţă (Q). Cromozomii sînt alcătuiţi dintr-o succesiune constantă şi caracteristică pentru fiecare pereche de cromozomi, de benzi colorate şi necolorate.

Benzile R (Dutrillaux şi Lejeune, 1971) au o distribuţie inversă benzilor G. Se evidenţiază prin denaturare termică menajată (85—87°C) şi colorare cu Giemsa.

Benzile C sînt situate în regiunea centromerică a unor cromozomi. La om se colorează şi regiunile din apropierea constricţiilor secundare ale cromozomilor 1, 9 şi 16. Se evidenţiază prin denaturare cu NaOH şi renaturare sau denaturare termică.

Modelul de benzi C al cromozomilor umani (conferinţa de la Paris, 1971):

Cromozomul	1	bandă mare pe braţele lungi
	2	bandă mică juxtacentromerică
	3—8	benzi mijlocii
	9	bandă mare pe braţele lungi
	10	bandă mijlocie (pe braţele lungi)
	11	bandă mijlocie, dar mai mare decît cea de pe cromozomul 10 şi 12
	12	bandă mijlocie
	13	bandă medie, uneori bipartită
	14—15	benzi medii
	16	bandă mare
	17	bandă medie
	18	bandă medie, mai mare decît cea de pe cromozomul 17
	19—20	benzi medii
	21	bandă pe braţul scurt
	22	bandă în regiunea centromerică
	X	bandă medie
	Y	bandă mică în jurul centromerului, bandă largă distală la braţele lungi.

S-a constatat că fluorescenţa unor zone cromozomiale sau intensitatea de colorare variază de la un individ la altul sau chiar în cadrul aceleiaşi perechi. În toate cazurile în care există o anomalie cromozomială numerică sau structurală se recomandă utilizarea concomitentă a două tehnici de bandare.

4.3. Cariotipul la cîteva specii de mamifere

Alcătuirea cariotipului la animale are la bază aceleaşi metode şi principii expuse anterior.

Mus musculus *(şoarecele)* are un cariotip care se caracterizează prin $2n = 40$ cromozomi, dintre care 38 autozomi şi 2 cromozomi ai sexului.

Prin metodele convenţionale de colorare, cromozomii sînt greu identificabili din cauză că sînt toţi acrocentrici. În anul 1972, „Comitetul pentru standardizarea nomenclaturii genetice la şoarece" propune standardizarea cariotipului după modelul de benzi folosind criterii similare celor utilizate pentru caracterizarea cromozomilor umani; regiunile au fost însă notate cu litere, iar benzile cu cifre arabe (fig. 11).

Rattus norvegicus *(şobolanul)* are complementul cromozomial alcătuit din $2n = 42$ cromozomi (40 autozomi şi 2 cromozomi ai sexului). Ţinînd seama de recomandarea Comitetului pentru standardizarea cariotipului la *R. norvegicus* (1973) de a se acorda prioritate lungimii cromozomilor şi de observaţiile personale Levan (1974) propune un sistem în care cromozomii să fie ordonaţi în patru grupe notate cu A, B, C şi D (tabelul nr. 16).

Tabelul nr. 16

Grupele de cromozomi la *Rattus norvegicus* (după Levan, 1974)

Grupele de cromozomi	Perechile de cromozomi incluse	Numărul de perechi
A	1—3	3
B	4—10, X, Y	8
C	11—13	3
D	14—20	7

Prin tehnicile convenţionale de colorare cu Giemsa pot fi identificate individual perechile de cromozomi din grupa A, cromozomul Y din grupa B şi numai la anumite linii cromozomul X, perechile de cromozomi 11, 12 şi 13 din grupa C. În ceea ce priveşte restul cromozomilor din complement ei pot fi identificaţi numai pentru grupele din care fac parte. Perfecţionarea tehnicilor de bandare a făcut posibilă identificarea fiecărei perechi de cromozomi din cariotip. De asemenea a devenit necesară standardizarea nomenclaturii benzilor cromozomiale. S-a constatat că modelul de benzi G obţinut prin colorare Giemsa după tratament cu tripsină este similar cu modelul de benzi obţinut prin colorare cu quinacrină (Mori şi Sasaki, 1973).

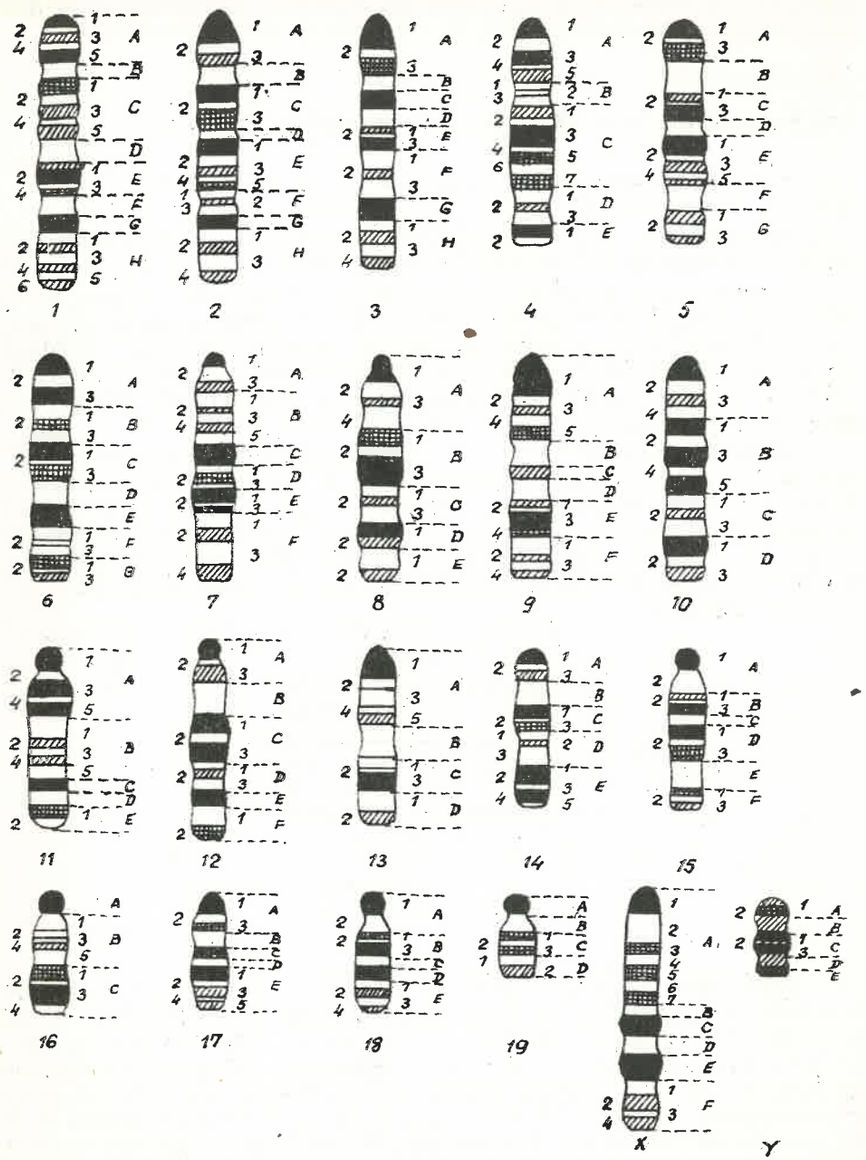


Fig. 11. — Idiograma reprezentînd benzile G de la *Mus musculus* (după Nesbitt și Franke, 1973).

Tabelul nr. 17

Modelul de benzi G în cariotipul de *Rattus norvegicus*

Numărul cromozomului	Brațul cromozomului	Numărul regiunii	Descrierea celor mai caracteristice benzi (banda nr.)
1	p	1	—
	q	5	bandă intensă proximală (21), bandă de intensitate medie (31), bandă distală negativă (41), bandă distală intensă (51)
2	q	4	bandă proximală (21), bandă medie (31), bandă distală intensă (41)
3	p	1	—
	q	4	bandă proximală intensă (21), bandă mediană (31), bandă distală intensă (41)
4	q	4	bandă proximală intensă (21), bandă de intensitate medie (31), bandă distală (41)
5	q	3	bandă proximală intensă (21), bandă de intensitate medie (31)
6	q	3	bandă de intensitate medie (21), bandă distală (31)
7	q	3	bandă proximală intensă (21), bandă de intensitate medie (31)
8	q	3	bandă proximală (21), bandă distală intensă (31)
9	q	3	bandă proximală (21), bandă mediană (31)
10	q	3	bandă proximală intensă (21), bandă distală (31)
11	p	1	—
	q	2	bandă de intensitate medie (21)
12	p	1	—
	q	1	—
13	p	1	—
	q	2	bandă mediană (21)
14	p	2	bandă mediană (21)
	q	2	bandă mediană negativă (21)
15	p	1	—
	q	2	bandă intensă mediană (21)
16	p	1	—
	q	1	—
17	p	1	—
	q	1	—
18	p	1	—
	q	1	—
19	p	1	—
	q	1	—
20	p	1	—
	q	1	—
X	q	3	bandă proximală (21), bandă intensă mediană (31)
Y	q	1	—

Levan (1974) propune un sistem de notare a benzilor G ale cromozomilor de la șobolan folosind criteriile stabilite pentru cromozomii umani la conferința de la Paris (1971), (tabelul nr. 17, fig. 12).

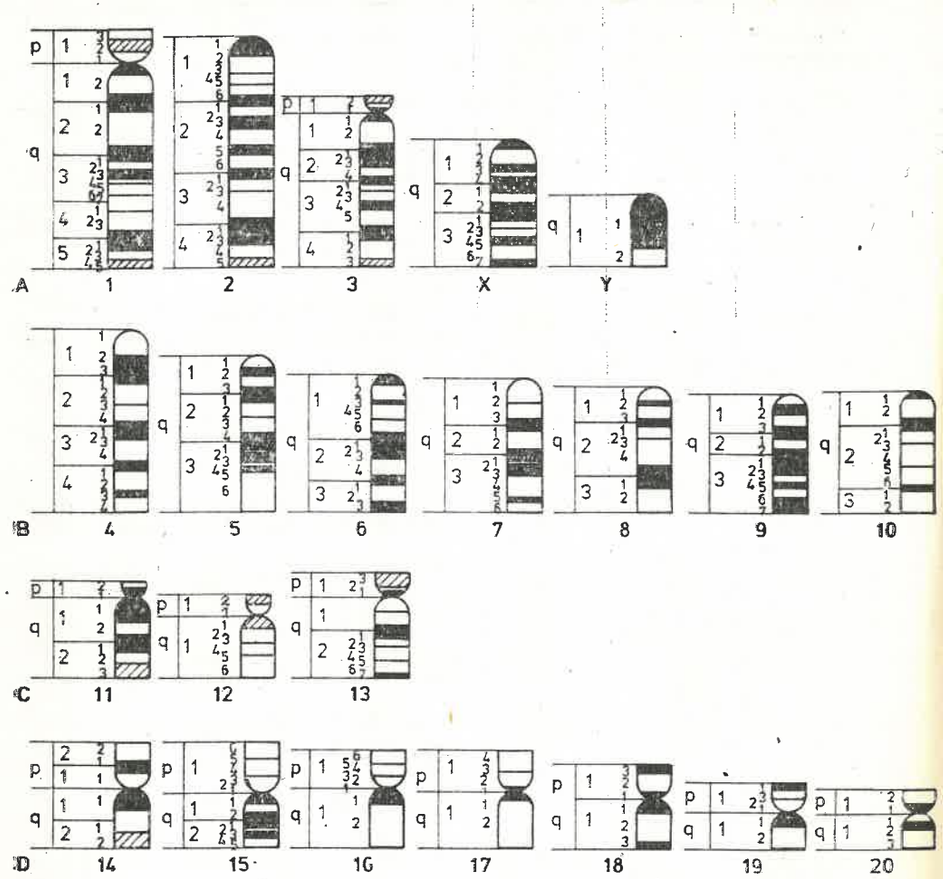


Fig. 12. — Modelul de benzi G la *Rattus norvegicus* (după Levan, 1974).

Cricetulus griseus *(hamsterul chinezesc)* are cariotipul alcătuit din $2n = 22$ cromozomi (20 autozomi și 2 cromozomi ai sexului). Prin tehnicile convenționale de colorare unele perechi de cromozomi (8, 9 și 10) se diferențiază unele de altele cu dificultate.

Tehnicile de colorare Giemsa după tratament cu tripsină, 2×SSC sau uree au făcut posibilă identificarea precisă a fiecărui cromozom din cariotipul hamsterului chinezesc pe preparate efectuate din celulele măduvei osoase hematoformatoare.

Modelul de benzi G (fig. 13) după Lavappa, Fu, Singh, Beyer și Epstein (1973) la hamsterul chinezesc: *cromozomul 1* este cel mai lung cromozom din complement. Are 7 benzi pe brațul scurt, 9 pe cel lung și cîte o regiune foarte palidă pe fiecare braț al cromozomului. *Cromozomul 2*

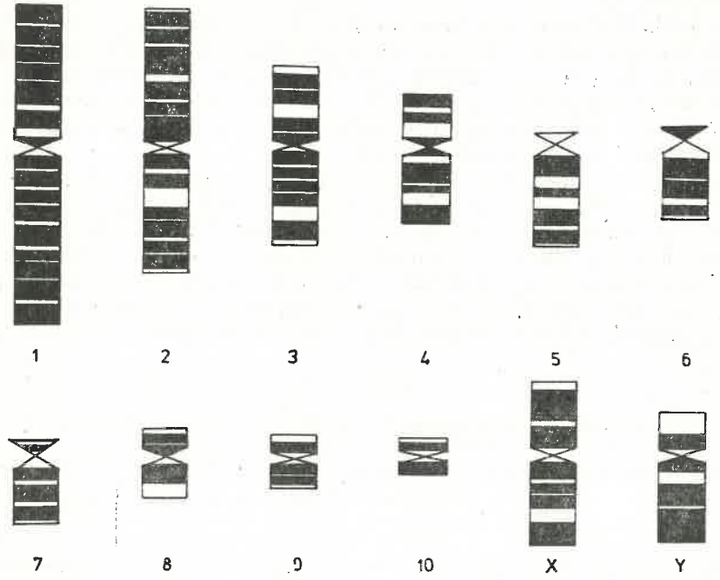


Fig. 13. — Reprezentarea diagramatică a modelului de benzi la hamsterul chinezesc *(Cricetulus griseus)* obținut prin tratamente cu uree și tripsină și colorat cu soluție Giemsa (după Lavappa și colab., 1973).

are 6 benzi intens colorate pe brațul scurt și 6 benzi pe brațul lung. *Cromozomul 3* are 4 benzi pe brațul scurt și 5 benzi pe cel lung. Zona juxtacentromerică este intens colorată. Caracteristic pentru acest cromozom sînt două benzi palide distincte, una situată după banda proximală de pe brațul scurt și cealaltă după banda distală de pe brațul lung. *Cromozomul 4* are două benzi intens colorate pe brațul scurt și 3 benzi pe brațul lung. Se observă o colorare intensă în regiunea juxtacentromerică. *Cromozomul 5* nu are benzi pe brațul scurt, are 4 benzi distincte pe brațul lung, dintre care banda proximală este mai lată. Pentru acest cromozom este caracteristică o regiune palidă în mijlocul brațului lung. *Cromozomul 6* are 3 benzi intens colorate pe brațul lung și o bandă pe brațul scurt. *Cromozomul 7* are 3 benzi intens colorate pe brațul lung, banda mediană fiind mai lată decît celelalte două. Pe brațul scurt are o singură bandă. *Cromozomul 8* are pe brațul scurt două benzi intens colorate și una pe brațul lung. *Cromozomul 9* are pe brațul scurt o singură bandă intens colorată și două pe brațul lung. *Cromozomul 10* are pe brațul lung o singură bandă intens colorată.

În ceea ce privește heterozomii: cromozomii X de la masculi și de la femele au același model de benzi, cu două benzi intens colorate pe bra-

ţul scurt şi 3 benzi pe cel lung. Pe fiecare braţ al cromozomului X există cîte o constricţie secundară. Cromozomul Y are pe braţul scurt o bandă intens colorată şi 3 benzi pe braţul lung. Cromozomul Y se colorează în general mai puţin intens decît ceilalţi cromozomi, cu excepţia regiunii juxtacentromerice.

Arvicola terrestris ssp. **scherman** *(şobolanul de apă)*. Studiul cariotipului la această specie a reliefat un număr diploid de cromozomi de 36, cu 17 perechi de autozomi dintre care : 10 perechi de metacentrici, 3 perechi de submetacentrici, 1 pereche de subtelocentrici şi 3 perechi de acrocentrici. Dintre heterozomi, cromozomul X este un metacentric mare, iar cromozomul Y un acrocentric mic.

Cariotipul şi idiograma la această specie studiate de Raicu şi colab. (1971) se deosebesc în multe privinţe de cariotipul şi idiograma de la *A. terrestris* ssp. *amphibius*, care trăieşte în nordul Europei. Această ultimă subspecie (Fredga, 1968) se caracterizează prin acelaşi număr de cromozomi ca şi subspecia *scherman* ($2n = 36$), dar tipurile morfologice de cromozomi sînt diferite : 9 perechi sînt metacentrici, 4 perechi submetacentrici şi 4 perechi subtelocentrici, iar acrocentricii lipsesc (tabelul nr. 18).

Tabelul nr. 18

Caracteristicile cromozomilor la *Arvicola terrestris* ssp. *scherman* (după Raicu şi colab., 1971)

Cromozomul	Poziţia centromerului	Lungimea absolută în μ Media $\pm$ eroarea	Lungimea relativă (nA + X) $^0/_{00}$	Raportul braţelor L/s
1	m	7,11±0,83	82,50	1,02
2	sm	6,83±0,82	79,86	2,62
3	m	6,11±0,84	70,96	1,42
4	m	5,84±0,69	67,80	1,17
5	m	5,69±0,75	66,01	1,67
6	sm	5,55±0,69	64,38	2,01
7	sm	5,44±0,60	63,06	2,34
8	m	5,14±0,61	59,58	1,42
9	m	4,82±0,61	56,47	1,33
10	m	4,72±0,55	54,84	1,36
11	a	4,68±0,53	54,31	—
12	m	4,44±0,49	51,52	1,32
13	st	2,84±0,11	34,40	4,99
14	m	2,80±0,11	32,92	1,28
15	m	2,66±0,34	30,98	1,02
16	a	2,60±0,40	30,13	—
17	a	1,90±0,29	22,08	—
X	m	6,75±1,27	78,30	1,70
Y	a	1,99±0,35	23,07	—

Diferenţele dintre cele două subspecii nu implică numai autozomii, ci şi heterozomii. Astfel, la ssp. *amphibius* cromozomul X este de mărime medie fiind al 13-lea element din cariotip (4,06 μ şi 58,3$^0/_{00}$ lungimea relativă), în timp ce la ssp. *scherman* cromozomul X este mult mai mare fiind al treilea element din cariotip după mărime (6,75 μ şi 78,30$^0/_{00}$ lungimea relativă). Cromozomul Y este identic la cele două subspecii, fiind un acrocentric de dimensiuni mici.

Aceste rezultate obţinute prin metodele convenţionale de colorare şi pe baza măsurătorilor indică existenţa unui polimorfism cromozomial intraspecific, care nu afectează numărul de cromozomi, ci numai structura lor.

4.4. Cariotipul la cîteva specii de plante

Studiul cariotipului la plante se efectuează pe baza aceloraşi criterii ca şi la animale şi anume : lungimea cromozomilor, raportul braţelor cromozomiale, poziţia constricţiilor secundare, prezenţa sateliţilor şi modelul de benzi. În ceea ce priveşte modul de ordonare a cromozomilor în cariotip şi idiogramă sînt unele diferenţe în funcţie de specie şi de autori.

Vicia faba *(bobul)* este una din plantele cele mai folosite în cercetările de citogenetică ; complementul cromozomial este alcătuit dintr-o pereche de cromozomi submetacentrici (M), avînd o lungime de circa 16,7 μ, şi cinci perechi de cromozomi subtelocentrici (S), cu o lungime cuprinsă între 8,2 şi 6,3 μ (Evans şi Bigger, 1961).

În anul 1972, Vosa şi Marchi au efectuat cercetări citogenetice comparative privind modelul de benzi Q şi G la cromozomii din metafaze C-mitotice la *V. faba*. Rezultatele cercetărilor au arătat că anumite benzi de pe cromozomul M şi cromozomii S sînt identice în cazul utilizării ambelor tehnici : tehnica de tratament cu quinacrină şi de colorare Giemsa după tratament cu soluţie saturată de hidroxid de bariu. Este interesant de menţionat că benzile care prin tratament cu quinacrină apar intens sau redus fluorescente, prin metoda Giemsa se colorează la fel de intens ; metoda Giemsa (BaOH) poate evidenţia însă benzi care nu sînt decelabile prin colorare cu quinacrină. Autorii consideră că atît similitudinile, cît şi diferenţele dintre modelele de benzi Q şi G la *V. faba* pot indica variaţii în ceea ce priveşte cantitatea de ADN-repetitiv sau alte însuşiri fizico-chimice ale segmentelor de cromozomi implicate.

Prin colorare cu quinacrină şi quinacrină-muştar, Vosa şi Marchi (1972) au constatat următoarele : cromozomul M are cel puţin două benzi intens fluorescente pe braţul scurt şi una pe braţul lung. Pe braţul scurt al cromozomului M deseori poate fi observată a treia bandă foarte îngustă. Toţi cromozomii S au o bandă îngustă intens fluorescentă pe braţul lung lîngă centromer, iar cromozomul S_a mai are o bandă intens fluorescentă în regiunea mijlocie a braţului lung.

Prin colorare Giemsa, cromozomul M are acelaşi model de benzi ca şi în cazul colorării cu quinacrină.

La cromozomii S se observă şi unele diferenţe :

S_a — o bandă intens colorată în regiunea mijlocie a braţului lung, dar într-o poziţie puţin mai apropiată de centromer decît banda corespunzătoare fluorescentă.

S_b — două benzi intens colorate în regiunea mijlocie a brațului lung.

S_c — pînă la patru benzi înguste, intens colorate în regiunea mijlocie a brațului lung. La metafazele cu cromozomii mai contractați deseori se observă o singură bandă centrală mai lată.

S_d — patru benzi înguste sau de lățime medie situate la distanțe aproximativ egale începînd din regiunea mijlocie a brațului lung spre centromer.

S_e — o bandă lată și una sau două mai înguste în regiunea mijlocie a brațului lung.

Allium cepa *(ceapa)* are cariotipul alcătuit din $2n = 16$ cromozomi. Dintre aceștia, perechile 1, 2 și 5 se identifică ușor datorită caracteristicilor lor și anume: perechea 1 are centromer subterminal și o constricție secundară pe brațul scurt, care separă o regiune sateliferă; perechea 2, alcătuită din cromozomi submetacentrici, este cea mai mică pereche din cariotip; perechea 5, mai mare, este alcătuită din cromozomi cu centromer median sau aproape median. Ceilalți cromozomi se grupează în două categorii: una cuprinde perechile 3 și 4, cu centromerul aproape median (cromozomi izobrahiali), cealaltă perechile 6, 7 și 8, cu centromerul submedian (cromozomi heterobrahiali) aranjați în ordine descrescătoare (tabelul nr. 19).

Tabelul nr. 19

Lungimea brațelor la cromozomii C-mitotici de *Allium cepa* (după Lima-de-Faria și colab., 1962)

Nr. cromozomului	Media lungimii brațelor (în μ)	
	brațul lung	brațul scurt
1	5,8	2,3
2	3,8	2,3
3	3,6	3,4
4	4,3	3,9
5	5,1	4,7
6	5,9	3,5
7	5,5	3,8
8	5,0	3,4

Secale cereale are cariotipul $2n = 14$. Descrierea și măsurătorile cromozomilor mitotici au fost făcute de mulți cercetători, printre care: Lewitsky (1931), Palak (1940), Levan (1942), Tjio și Levan (1950), Sybenga (1960), Lima-de-Faria (1962) și alții. Heneen (1962) ordonează cromozomii de la secară în 4 grupe:

1 — două perechi de cromozomi cu centromerul median spre submedian,

2 — două perechi de cromozomi cu centromerul submedian,

3 — două perechi de cromozomi cu centromerul submedian spre subterminal,

4 — o pereche de cromozomi cu centromerul submedian și cu o constricție secundară clară pe brațul scurt, care delimitează un satelit.

Cromozomul 1 face parte din prima grupă, avînd o lungime relativă de 15,02. Fiecare braț are constricții secundare slabe, care împart brațul scurt în două segmente aproximativ egale și brațul lung în două segmente inegale. *Cromozomul 2* este relativ mai mic, cu centromer aproape median și cu o lungime relativă de 13,91. La acest cromozom nu s-a evidențiat nici o constricție secundară. *Cromozomul 3* are o lungime relativă de 14,89 și centromer submedian; pe brațul scurt prezintă un satelit punctiform. *Cromozomul 4* este ceva mai scurt decît precedentul (lungimea relativă 14,58) și are centromerul subterminal. Pe brațul scurt, o constricție secundară vagă separă o regiune sateliferă care nu este despărțită de restul cromozomului. Brațul lung este împărțit în două părți inegale printr-o constricție clară. Acest cromozom are o morfologie caracteristică ca și cînd ar fi format din trei segmente. *Cromozomul 5* este un cromozom lung (lungimea relativă 14,55). Centromerul este situat în regiunea submediană spre cea subterminală. Brațul scurt are la capăt un satelit legat de rest printr-un fir subțire de cromatină. Aproximativ 1/3 din brațul lung (adiacentă centromerului) are o heterocromatină intens pozitivă, restul colorîndu-se mult mai slab. *Cromozomul 6* este relativ scurt (lungimea relativă 13,65) și are centromerul subterminal. Brațul scurt poartă un mic satelit atașat printr-un fir subțire de cromatină. La jumătatea brațului scurt se observă o altă constricție secundară, mai vagă, precum și la capătul distal al brațului lung. *Cromozomul 7* este cel mai mic cromozom și are centromerul submedian. Acesta este cel mai distinct cromozom satelifer al cariotipului, avînd o constricție secundară pronunțată pe brațul scurt. Constricția secundară mare este singura constricție asociată cu formarea nucleolului, motiv pentru care acest cromozom este denumit „nucleolar" (această afirmație este sprijinită și de prezența a numai doi nucleoli în telofaza mitotică tîrzie). Celelalte constricții secundare, evidențiabile în unele stadii ale mitozei sau după anumite tratamente ale materialului, cum ar fi, de pildă, pretratamentul cu temperaturi joase (0°C) imediat după germinare sau pretratamentul cu hidroxiquinoleină, par a nu avea vreo legătură cu formarea nucleolului în condiții normale.

Sybenga (1960) a obținut date relativ diferite folosind următoarea metodă de preparare a cromozomilor: rădăcinile au fost pretratate cu α-bromnaftalen, după care au fost fixate și hidrolizate în HCl 1N, la 60°C. Colorarea s-a făcut cu orceină acetică. Lungimea cromozomilor s-a determinat prin proiecția unui film negativ, fotografierea fiind executată cu un obiectiv cu imersie. S-au efectuat cîte 10 măsurători pentru fiecare braț cromozomial (tabelul nr. 20).

Darvey și Gustafsson (1975) propun un alt mod de ordonare a celor 7 tipuri de cromozomi de la secară pe baza modelului de benzi C. Bennett, Gustafsson și Smith (1977), folosind acest model de ordonare a cromozomilor în cariotip și idiogramă la secară, efectuează cercetări comparative privind cantitatea de ADN nuclear, modelul de benzi C și proporția heterocromatinei telomerice în genom la 16 taxoni din cadrul genului *Secale* (fig. 14).

Tabelul nr. 20

Lungimea cromozomilor la *Secale cereale* în % din lungimea totală și raportul dintre brațe (după Sybenga, 1960)

Cromozomul	Poziția centromerului	Lungimea cromozomilor			Raportul brațelor
		braț lung	braț scurt	suma	
1	sm	8,88	6,54	15,42	1,359
2	m	7,78	7,10	14,88	1,096
3	st	9,12	5,15	14,28	1,770
4	sm	8,10	6,00	14,10	1,351
5	st	8,74	5,29	14,03	1,652
6	m	7,30	6,42	13,72	1,138
7	sm	7,58	6,00	13,58	1,264
	SAT		Total :	100,00	9,630
			Media :	14,29	1,376

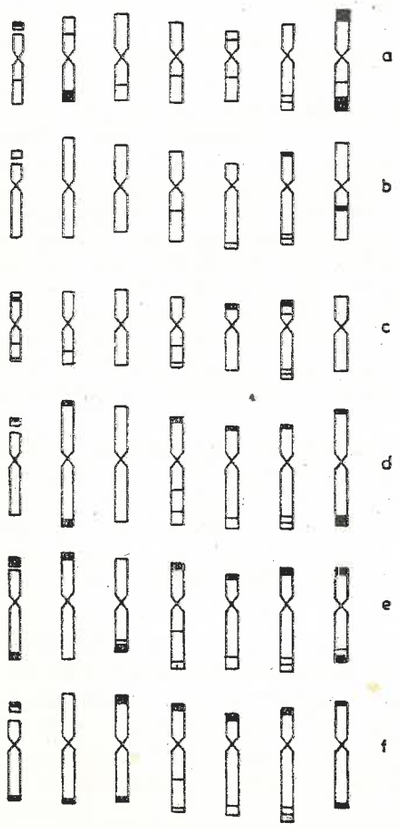


Fig. 14. — Modelul de benzi C la: *Secale montanum* (a), *S. africanum* (b), *S. silvestre* (c) și 3 subspecii de *S. cereale*: ssp. *vegetale* (d), ssp. *cereale*, soiul *Petkus* (e) și ssp. *ancestrale* (f) (după Benett și colab., 1977).

Prin compararea distribuției și mărimii benzilor C la un cromozom individual, la diferiți taxoni din cadrul genului, s-au făcut observații interesante din punct de vedere evolutiv. Ș-a observat că numai *S. cereale* și *S. africanum* au în mod constant benzi intercalare pe brațul cu satelit al cromozomului 1, cele de la *S. cereale* fiind mai late decît cele de la *S. africanum*. Cromozomul 2 (submedian) are 1—2 benzi terminale C; la taxonii cu o singură bandă terminală C, aceasta a fost studiată totdeauna pe brațul lung, iar la taxonii cu două benzi terminale C cea mai mare a fost situată pe brațul lung (excepție a făcut *S. cereale* la care banda mai lată s-a aflat pe brațul scurt). Această schimbare ar putea indica faptul că cromozomul 2 a fost implicat într-una din translocațiile despre care se știe că au avut loc în timpul evoluției la *S. cereale*. Cromozomul 3 (median) prezintă o variație mare între taxoni, care constau în absența unor benzi terminale C la *S. africanum* și prezența a două benzi terminale C late la *S. ancestrale*. Cromozomii 4, 5 și 6 (submediani) variază puțin unul față de celălalt la diferiți taxoni. Cromozomul 7 diferă cel mai mult între taxoni, în ceea ce privește atît mărimea totală, cît și mărimea benzilor terminale C. Astfel, la *S. silvestre* s-au observat două benzi mici, în timp ce la *S. montanum* două benzi late. Cele mai multe benzi intercalare au avut o mărime și poziție inconstante, atît în interiorul celulelor, cît și între celulele de pe aceeași lamă. Din această cauză nu s-au efectuat analize sistematice ale lor și nu au fost reprezentate în idiogramă.

Proporția heterocromatinei telomerice în genom la diferiți taxoni a fost cuprinsă între 6% la *S. silvestre* și *S. africanum* și 12% la secara cultivată.

O comparație detaliată între cantitatea de ADN 4 C și proporția heterocromatinei din genom la 9 taxoni nu a indicat existența unei corelații mari între acestea. Totuși, sînt unele date care pledează pentru modificări evolutive majore în structura genomurilor de *Secale*, în care se pare că a fost implicată adiția heterocromatinei la telomere sau aproape de ele. Se sugerează că ar fi avut loc evenimente de amplificare a ADN la nivelul telomerelor, care au determinat o creștere masivă a cantității de ADN. Ulterior, un crossing-over inegal între omologi ar fi putut avea un anumit rol în mărirea gradului de variație a cantității de heterocromatină la telomerele aceluiași cromozom, de la diferiți taxoni. Translocațiile, de asemenea, au contribuit la creșterea sau scăderea cantității de ADN la nivelul telomerelor, la cromozomi diferiți ai complementului.

5 Metode de creştere, studiu citogenetic şi analiză genetică la *Drosophila melanogaster*

Prin folosirea insectei *Drosophila melanogaster* ca obiect de studiu în genetică, Morgan şi colaboratorii săi, Bridges, Sturtevant şi Muller, au elaborat cunoscuta teorie cromozomială a eredităţii, aducînd astfel o contribuţie uriaşă la dezvoltarea ştiinţelor biologice. Astfel pot fi abordate numeroase probleme de genetică, începînd cu principiile fundamentale ale transmiterii genelor, fenomenul de linkage şi de crossing-over, determinismul genetic al sexelor, interacţiunea genelor, studiul aberaţiilor cromozomiale şi efectele agenţilor mutageni, cercetări moderne de citogenetică moleculară şi de genetica populaţiilor.

Dintre avantajele pe care le prezintă *D. melanogaster* amintim următoarele:

— Se poate cultiva în laborator pe medii relativ simple şi uşor de pregătit, în condiţii de creştere controlabile şi într-un spaţiu relativ mic.

— Ciclul de viaţă este relativ scurt, o generaţie putînd fi obţinută în 10—12 zile la 25°C. O pereche de genitori produce cîteva sute de descendenţi, astfel că într-un an poate fi studiat un număr mare de generaţii succesive, iar numărul mare de descendenţi permite interpretarea statistică a rezultatelor.

— Numărul de cromozomi somatici este mic ($2n = 8$) şi cromozomii pot fi uşor identificaţi datorită particularităţilor morfologice.

— Se cunosc numeroase mutaţii care afectează diferite caractere şi însuşiri, ce pot fi folosite în analiza genetică.

— În nucleii glandelor salivare ale larvelor în stadiul III s-au evidenţiat cromozomii politeni cu o morfologie particulară, care a făcut posibilă alcătuirea primei hărţi cromozomiale citogenetice.

Stadiile de dezvoltare sînt dependente de condiţiile mediului şi în mod deosebit de temperatură. La 20°C, ciclul vital (ou — larvă — pupă — imago) se desfăşoară în circa 15 zile, iar la 25°C în 10 zile (Demerec şi Kaufmann, 1962). Temperatura de peste 30°C determină sterilizarea sau moartea insectelor. Temperatura scăzută prelungeşte ciclul vital şi determină o scădere a vitalităţii. La 10°C, ciclul vital durează 57 de zile, iar la 15°C 18 zile. Menţionăm că la temperatura mediului ambiant se adaugă temperatura ce se degajă în vas ca urmare a procesului de fermentaţie. Culturile de *D. melanogaster* trebuie păstrate la o temperatură cuprinsă între 20 şi 25°C.

5.1. Metoda de creştere în laborator

Pentru creşterea *D. melanogaster* ($2n = 8$) în laborator sînt necesare medii de cultură sintetice în compoziţia cărora trebuie să intre zahărul şi drojdia de bere.

Mediul de mălai (componenta principală este mălaiul = făina de porumb):

— Făină de porumb	150 g
— Zahăr	100 g
— Agar-agar	10 g
— Drojdie de bere	15 g
— Acid propionic	5 ml
— Apă de robinet	1 000 ml

Se amestecă toate componentele şi se fierb pînă se dizolvă agarul, obţinîndu-se un mediu mai mult sau mai puţin consistent. Mediul astfel pregătit se toarnă cald în vase de sticlă special confecţionate din tub de sticlă (diametrul 3 cm, lungimea 8—9 cm) sau în borcane mai mici de sticlă, într-un strat de 1,5—2 cm. După răcire, în fiecare vas se mai adaugă puţină drojdie de bere proaspătă pentru a grăbi declanşarea fermentaţiei, dezvoltarea şi înmulţirea drojdiei. Acidul propionic se adaugă pentru a împiedica creşterea mucegaiului, evitînd astfel infectarea culturilor.

Pentru pregătirea mediului se mai poate proceda astfel: în 2/3 din cantitatea totală de apă se dizolvă, prin fierbere, agarul. Se adaugă celelalte componente şi se aduce din nou la punctul de fierbere. În acelaşi timp, în 1/3 din apa rămasă se amestecă făina de porumb şi se adaugă în vasul în care se află agarul dizolvat, împreună cu celelalte componente. Se adaugă acid propionic (sau timol) şi se continuă fierberea încă cîteva minute, agitîndu-se în permanenţă pînă cînd mediul devine semilichid.

Mediul de griş (componenta principală este grişul):

— Griş	50 g
— Zahăr	50 g
— Agar-agar	10 g
— Drojdie de bere	15 g
— Acid propionic	5 ml
— Apă de robinet	1 000 ml

Într-un vas smălţuit, în care se află 2/3 din cantitatea de apă, se dizolvă, prin fierbere agarul, apoi se adaugă drojdia şi se continuă fierberea, 45 minute, pînă se obţine o suspensie. În restul de 1/3 de apă se pun grişul şi zahărul, care se adaugă suspensiei de agar şi drojdie. Se continuă fierberea încă 15 minute pînă se obţine un mediu de consistenţa mierei de albine. Se lasă cîteva minite să se răcească şi se toarnă în vasele de cultură.

Mediul de făină de porumb, melasă şi uruială de ovăz:

— Făină de porumb	14,0%
— Melasă	11,0%
— Uruială de ovăz	1,6%
— Acid propionic	0,7%
— Apă de robinet	72,7%

Melasa şi uruiala se fierb în 2/3 apă, iar făina de porumb se amestecă în restul de 1/3 apă. Se fierb împreună pînă se creează condiţii pentru gelificare. În cazul în care mediul este moale, se adaugă o cantitate mică de agar. Avantajul acestui mediu este că nu necesită agar, care este destul de costisitor şi greu de procurat.

Mediul de făină de grîu:

— Făină de grîu 10,3%
— Melasă 11,5%
— Acid propionic 0,7%
— Apă de robinet 77,5%

În 2/3 din apă se fierbe melasa, iar în cealaltă 1/3 de apă se pregăteşte coca de grîu. Se amestecă şi se fierb împreună, pînă ce mediul devine consistent.

Mediul de banane. O bucată de banană coaptă bine se imersionează într-o suspensie de drojdie de bere. Acest mediu se foloseşte mai rar, deoarece înmuindu-se îngreuiază scoaterea insectelor din vas în momentul eclozionării. În locul bananelor se pot folosi pere, prune, struguri, imersionate într-o suspensie de drojdie de bere.

Un mediu de cultură pentru a fi folosit cu rezultate bune trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:

— să fie consistent (pentru aceasta se adaugă agar), evitînd scufundarea în mediu a insectelor, în momentul eclozionării;

— să conţină o cantitate suficientă de zahăr, necesar pentru hrana larvelor şi a insectelor adulte, precum şi pentru declanşarea dezvoltării şi înmulţirii drojdiei de bere.

Mediul se toarnă în vasele de cultură cu ajutorul unui pahar Berzelius sau al unui dispozitiv confecţionat astfel: la o pîlnie de sticlă, cu diametrul de 10 cm, care se fixează la un suport metalic, se ataşează un furtun de cauciuc, cu diametrul de 1 cm, şi prevăzut cu o clemă. Grosimea stratului de mediu se recomandă să fie de 1,5—2 cm. Înainte de folosire, vasele de cultură şi dispozitivele de turnare trebuie bine spălate şi sterilizate, pentru a evita infectarea culturilor. Vasele care conţin mediu se acoperă cu o pînză sau un tifon curat, lăsîndu-se să se răcească, iar după răcire completă, pe suprafaţa mediului se adaugă puţină drojdie de bere comprimată, proaspătă, care determină fermentarea zahărului. În unele laboratoare, drojdia se adaugă sub forma unei suspensii în apă distilată sterilizată. Se recomandă ca turnarea mediului să se facă cu atenţie pentru a nu se murdări pereţii vasului. Apoi vasele se astupă bine cu dopuri de vată sau tifon, sterilizate.

Mediul de cultură astfel pregătit poate fi folosit imediat, în vederea menţinerii şi înmulţirii colecţiei de *Drosophila* sau pentru diferite experienţe, sau poate fi păstrat timp de cîteva zile în frigider (+4°C).

Insectele trebuie transferate pe mediul de cultură proaspăt pregătit în momentul cînd drojdia a început să se înmulţească şi să se dezvolte bine. Acest lucru se poate aprecia prin apariţia la suprafaţa mediului ai unei pîsle albicioase, formată din miceliul ciupercii, şi prin apariţia unui miros specific. În vederea creării condiţiilor ca un număr cît mai mare de larve să împupeze, se recomandă ca în vasul de cultură să se introducă o bucată de hîrtie, carton, material plastic, placaj etc., lată de 2 cm, aşezată înclinat la 45°C. Transferarea insectelor trebuie să se facă cu multă

atenţie pentru a evita pătunderea în vas a unor insecte ce aparţin altei linii. După cîteva zile, femelele depun ouă care se transformă în larve.

Cînd sînt create condiţii optime de dezvoltare, insectele apar în număr foarte mare şi desfăşoară o vie activitate, brăzdînd în toate direcţiile mediul, fiind foarte vorace. Aceasta constituie dealtfel şi un indiciu preţios asupra modului în care decurge cultura.

Recunoaşterea sexului. Evidenţierea cromozomilor uriaşi se efectuează de obicei în glandele salivare ale larvelor femele, care sînt mai mari. De asemenea, în experienţele în care se urmăreşte efectul unor agenţi mutageni chimici sau fizici sau transmiterea unor caractere legate de sex se folosesc larve femele, deoarece acestea primesc un cromozom X de la genitorul patern care poate fi marcat şi identificat în descendenţă. În experienţele de hibridare este, de asemenea, necesară recunoaşterea sexului, la larve şi adulţi.

Sexul larvelor se evidenţiază după poziţia şi mărimea gonadelor. Gonadele se găsesc aşezate în partea posterioară şi laterală a larvei (în corpii graşi). Testiculele larvei sînt mult mai mari decît ovarele şi au o formă ovală. Evidenţierea sexului în stare larvară se poate face cu ochiul liber sau cu ajutorul unei lupe binoculare.

După cum este cunoscut *D. melanogaster* prezintă dimorfism sexual. Insectele adulte se deosebesc după următoarele criterii: abdomenul femelei este alcătuit din 7 segmente, care se observă uşor cu ochiul liber, iar al masculului din 5 segmente; vîrful abdomenului la femelă este alungit, iar la mascul ceva mai rotund şi cu ultimele două segmente colorate în maron-negru; după depunerea ouălor, abdomenul femelelor se umflă. Masculul prezintă, faţă de femelă, aşa-numitul pieptene sexual, format din 10 perişori negri, rigizi, puternici, ce se găsesc pe suprafaţa încheieturii tarsale a piciorului anterior.

Aparatura necesară pentru efectuarea experienţelor de genetică în condiţii optime şi cu rezultate bune:

— Cameră termostatată, cu o temperatură constantă de 20°C, în special pe timpul iernii, deoarece vara culturile cresc foarte bine la temperatura obişnuită a camerei.

— Vase de cultură, cu diametrul de 3 cm şi lungimea de 8 cm, ce pot fi confecţionate din tub de sticlă.

— Lupă binoculară, cristalizoare, sticle de ceas, capsule de porţelan, ace spatulate ascuţite, pensete, pensule etc.

— Materiale ce intră în compoziţia mediului de cultură.

Pentru manipularea fiolelor cu *Drosophila*, în timpul studiului sau cînd sînt transferate dintr-un vas în altul, în vederea liniştirii lor se face o uşoară eterizare.

Eterizarea se efectuează în acelaşi tip de vase în care se cresc insectele sau în orice vas de sticlă cu acelaşi diametru. De dopul vasului eterizator, confecţionat din plută sau cauciuc, se ataşează un cîrlig de care se fixează, prin înfăşurare sau într-un mic taler confecţionat din plasă de sîrmă, vată îmbibată cu eter etilic. Se recomandă să se folosească o cantitate mică de eter, pentru a nu omorî insectele. Vasele în care se găsesc adulţii se agită pînă cînd toate insectele cad la fundul lui, apoi cu o mişcare rapidă se îndepărtează dopul, în locul lui plasîndu-se vasul eterizator în care se recoltează insectele.

Insectele astfel eterizate pot fi examinate pe o suprafață albă (carton sau hîrtie albă), sau în cazul în care ele prezintă anumite caractere (culoarea ochilor sau a corpului) ce nu pot fi bine evidențiate pe o suprafață albă se recomandă folosirea unei plăci de culoare închisă, în funcție de culoarea caracterului studiat. Examinarea se efectuează bine cu ajutorul unei lupe binoculare sau cu un microscop stereoscopic. Pentru o mai bună observație a caracterelor care interesează studiul respectiv, insectele sînt manevrate cu o pensulă mică sau cu un ac spatulat cu vîrful de cupru.

În cazul în care insectele încep să se miște, se efectuează o nouă eterizare, care se poate face în bune condiții plasînd pe placa pe care se găsesc insectele un tampon de vată îmbibat cu eter; pentru a împiedica evaporarea rapidă a eterului și zborul insectelor se acoperă cu capacul de la o cutie Petri sau cu o sticlă de ceas.

La pregătirea unei noi culturi se folosesc 5—10 perechi de genitori. Alegerea femelelor și a masculilor se face după criteriile enunțate. În studiile experimentale se recomandă să se folosească femele virgine, care se recoltează astfel: a) se scot insectele bătrîne din vasul de cultură și sînt reținute pentru experiențe toate femelele apărute în primele 6 ore, fiind virgine; b) se recoltează larvele din stadiul III sau pupe și sînt mutate în fiole de sticlă, în fiecare fiolă punîndu-se o singură larvă sau pupă.

Sînt necesare cîteva recomandări. Insectele eterizate nu trebuie puse imediat în vasul de cultură, pentru a evita scufundarea lor în mediu, înainte de a se trezi. Colecția trebuie schimbată la 3—4 săptămîni, în funcție de temperatura la care se desfășoară ciclul vital. Trebuie să se păstreze două culturi paralele, în eventualitatea că una s-ar infecta sau ar muri; este util să nu se amestece insectele din diferite linii, lucrîndu-se numai cu o singură linie și numai cînd avem garanția că în camera respectivă nu se găsesc insecte din altă linie. După alegerea genitorilor este bine să se verifice din nou sexul și în mod deosebit dacă aparțin liniilor luate în studiu. Se mai recomandă ca toate operațiile de montare a unei experiențe: identificarea sexului, alegerea genitorilor, calcularea rezultatelor să se facă cu ajutorul eterizării.

Fiecare vas se etichetează cu următoarele date: liniile sau mutantele ce au luat parte la experiențe, data montării experienței, cine a efectuat experiența. Înainte de apariția insectelor (după aproximativ 7—9 zile de la montarea experienței) se îndepărtează genitorii pentru a fi excluși din calcule.

5.2. Metode pentru studiul cromozomilor mitotici

Cromozomii mitotici pot fi studiați în celulele neuroblastice din ganglionii larvei în stadiul III. Se efectuează disecția ganglionilor cerebroizi (dorsal și ventral) și a discului imaginal într-o soluție hipotonică de citrat de sodiu (1 g citrat de sodiu în 100 cm^3 apă distilată). După disecție, ganglionii sînt transferați într-o picătură de soluție proaspătă de citrat de sodiu, pentru 10 minute, apoi ganglionii și discul sînt transferați într-o soluție de acid acetic 50%, pentru 15 minute.

Preparatele se fac cu rezultate bune prin metoda rapidă: se ia o lamă curată și uscată pe care se transferă țesutul, peste care se pune o picătură de fucsină bazică (reactivul Schiff) sau carmin acetic. După 2—3 minute, timp suficient pentru colorare, țesutul este acoperit cu o lamelă și se efectuează o ușoară etalare. Pentru etalarea materialului și îndepărtarea excesului de colorant deasupra lamelei se pune o bucată de hîrtie de filtru și se presează ușor cu degetul mare. Preparatul se observă la microscopul cu contrast de fază.

După efectuarea unei cît mai bune etalări, lama este trecută într-un vas cu gheață, pentru cel puțin 30 minute, apoi cu o lamă de ras se desprinde lamela. Lama cu preparatul se introduce în alcool absolut, 5 minute, pentru deshidratare. S-a observat că odată cu mărirea timpului de imersionare în alcool se îmbunătățește calitatea preparatului. După scoaterea preparatului din alcool, peste materialul etalat se pune o picătură de orceină acetică 2% sau carmin acetic 2%. Preparatele se montează în euparal sau balsam de Canada; în cazul balsamului de Canada, lamele trebuie trecute, după scoaterea din alcool, prin 1—2 băi de xilol.

Uneori se recomandă ca în mediul de cultură să se adauge o soluție de colchicină 0,04 % cu două ore înainte de sacrificarea larvelor. În felul acesta, la larvele care se hrănesc cu mediu în care se găsește colchicină se acumulează un număr mare de metafaze. Numărul de cromozomi somatici la *D. melanogaster* este de 8. Femela are o pereche de cromozomi omologi XX, în timp ce masculul are un singur cromozom X și un cromozom neomolog Y. Cromozomul X are forma unui baston, datorită faptului că centromerul este plasat în regiunea terminală, iar cromozomul Y are forma unui baston frînt, avînd centromerul plasat în regiunea submediană. Cromozomii mitotici au fost notați cu X, X, 2, 3, 4 (la femelă) și X, Y, 2, 3, 4 (la mascul). Cromozomii perechilor 2 și 3 au forma unui V cu brațele mai mult sau mai puțin egale, fiind metacentrici, iar cromozomii perechii 4 sînt punctiformi.

5.3. Metode pentru studiul cromozomilor uriași

Cercetările lui Balbiani (1881) au evidențiat existența unor nuclei uriași în celulele glandelor salivare de la larvele unor chironomide. Ulterior, asemenea nuclei uriași au fost evidențiați la numeroase diptere, printre care și la *D. melanogaster*. Semnificația lor a fost apreciată abia în 1933, cînd s-au stabilit anumite corelații între structura lor și modul de plasare a genelor pe cromozomi.

Painter (1934) a arătat că în nucleii uriași din celulele glandelor salivare se află un filament lung, cilindric, răsucit, alcătuit din 5 brațe lungi și unul foarte scurt, toate unite într-un punct central numit cromocentru, la nivelul centromerilor; toate brațele sînt notate prin analogie cu cele 4 perechi de cromozomi somatici. La femelă — cu X cromozomii sexuali pereche, care se găsesc uniți, cu 2 L și 2 R brațele din stînga, respectiv din dreapta perechii a doua de cromozomi, cu 3 L și 3 R brațele din stînga, respectiv dreapta perechii a treia, cu 4 cromozomii perechii a patra, care sînt extrem de mici. La mascul, cromozomul Y este extrem

de mic, încît uneori cu greu poate fi identificat, iar cromozomul X apare mai subțire și se colorează mai puțin intens.

Fiecare braț este dublu, fiind format din doi cromozomi omologi, unul de origine maternă, altul de origine paternă. De obicei, acești cromozomi sînt foarte greu de identificat, deoarece se găsesc foarte strîns lipiți unul de altul datorită omologiei genelor pe care le conțin. În cazul unor organisme heterozigote, secvența genelor pe cromozomii materni și paterni poate fi diferită, fapt pentru care cei doi cromozomi pot fi identificați neexistînd omologie între unele gene, cromozomii nu se împerechează perfect pe toată lungimea și în unele regiuni cu gene nealele se formează bucle ce pot fi observate ușor la microscop. Aceste formațiuni pot fi observate mai ales în cazul unor translocații și inversiuni.

Lungimea totală a acestor cromozomi uriași este de 1 180 μ, fiind de 157 ori mai lungi decît cromozomii din celulele somatice. Brațele au următoarele dimensiuni : perechea I (X) 220 μ ; perechea II 215 μ și 245 μ ; perechea III 210 μ și 275 μ ; perechea IV 15 μ.

Celulele glandelor salivare nu se divid niciodată, iar la începutul metafazei ele degenerează. Celulele și cromozomii cresc prin procese endomitotice în timpul cărora cromozomii se replică de 8—9 sau 10 ori, încît cantitatea de ADN crește aproape geometric. Produșii fiecărui ciclu de replicare succesivă rămîn alăturați, formînd cromozomii politeni, care sînt alcătuiți dintr-o succesiune de benzi transversale heterocromatice și benzi acromatice. Unele benzi sînt difuze și îngroșate („puffe" sau inelele lui Balbiani), iar la nivelul acestora, conform unor cercetări relativ recente, se realizează sinteza activă de ARN. Colorarea cromozomilor politeni, prin metoda carmin acetic sau Feulgen, a arătat că sînt formați din peste 5 000 de benzi transversale, alcătuite din 16 puncte. Distribuția și morfologia acestor benzi de-a lungul cromozomilor este constantă, astfel că ele au putut fi identificate și numerotate.

Socotind că lungimea totală a cromozomilor uriași este de 1 180 μ, ea a fost împărțită în 100 de diviziuni, după cum urmează : perechea I, 0—20 diviziuni ; perechea II, 20—60 ; perechea III, 60—100 ; cea de a IV-a pereche de cromozomi nu figurează în această împărțire, avînd o lungime extrem de mică. Fiecare diviziune cuprinde 6 subdiviziuni, notate astfel : A, B, C, D, E și F, iar în fiecare subdiviziune există un număr variabil de benzi transversale, care au fost numerotate. Pe această bază, Bridges și colab. (1944) au revizuit harta genetică a *D. melanogaster*, stabilind o corespondență între locii genelor și benzile transversale din cromozomii uriași din celulele glandelor salivare, alcătuind harta citogenetică.

Pentru evidențierea cromozomilor din celulele glandelor salivare se folosesc larve din stadiul III, bine dezvoltate. De aceea se recomandă ca numărul larvelor într-un vas de cultură să fie limitat și să li se asigure condiții optime de creștere. Dezvoltarea larvelor trebuie să aibă loc la o temperatură relativ scăzută (16—18°C). Glandele salivare se recoltează de la larve complet dezvoltate, care urmează să se transforme în pupe și care ies din mediul nutritiv și aderă la peretele vasului. Pentru a încetini dezvoltarea larvelor sau a împiedica transformarea lor în pupe se recomandă păstrarea culturilor cu larve la frigider (8°C). În general se folosesc pentru studiu aproape exclusiv femele care sînt mai mari și au un cromozom X de la genitorul patern, ce poate fi marcat și identificat în descendență.

În glandele salivare ale larvelor mascule, cromozomii sînt reduși ca mărime, din care cauză se disting cu mare greutate, iar cromozomul X al masculului este mai subțire decît cromozomul X al femelei și se colorează mai puțin intens. Aceasta se datorește probabil și faptului că larvele mascule sînt mult mai mici decît cele femele.

Glandele salivare sînt plasate în partea anterioară în imediata apropiere a ganglionului cerebroid. Pentru disecția glandelor, larvele sînt puse într-o picătură de soluție saturată de carmin acetic, care se prepară dizolvînd carminul în acid acetic glacial 45 % și se fierbe două ore, folosindu-se un condensator cu reflux. Carminul nedizolvat este eliminat prin decantare și filtrare. O astfel de soluție, fiind prea concentrată, se diluează adăugîndu-se o cantitate egală de acid acetic 45 %.

La o lupă binocular, sau chiar cu ochiul liber, se execută disecția glandelor salivare, folosind două ace de disecție. Cu un ac se fixează bine larva, iar cu celălalt se prinde armătura bucală și se execută o mișcare de smulgere în direcția axului longitudinal al larvei. Se îndepărtează restul organelor, care eventual ies odată cu glandele salivare.

Glandele salivare se țin în colorant circa 3 minute. După colorare, ele sînt transferate pe o lamă de sticlă curată într-o altă picătură de colorant și se acoperă cu o lamelă. Pentru intensificarea colorării lama poate fi încălzită 2 minute la flacăra unei lămpi cu spirt. Peste lamelă se așază o bucată de hîrtie de filtru, care absoarbe excesul de colorant și prin apăsare cu degetul mare sau prin ușoare lovituri în lamelă se efectuează etalarea. Preparatele astfel pregătite sînt studiate cu obiectivul cu imersie.

În cazul cînd examinarea la microscop se prelungește se adaugă, din cînd în cînd, pe marginea lamelei, cîte o picătură de soluție de carmin acetic, pe măsură ce soluția dintre lamă și lamelă se evaporă. Pentru păstrarea preparatului cîteva zile se recomandă parafinarea marginilor lamelei și introducerea preparatului în frigider.

Cromozomii uriași pot fi studiați și în preparate permanente care pot fi păstrate timp nelimitat. Pentru efectuarea acestor preparate, lama se unge în prealabil cu o peliculă fină de albumină glicerinată (care lipește cromozomii de lamă), se lasă cîteva minute pentru a se usca și apoi se fac preparate de tip squash. Lamele astfel pregătite se pun în poziție verticală într-un cristalizor, pe fundul căruia se găsește hîrtia de filtru îmbibată cu alcool etilic de 95°, care trebuie să atingă marginea inferioară a lamelelor. Se lasă aici 22 de ore pentru deshidratare, după care se imersionează în alcool etilic 95°. Apoi se îndepărtează cu atenție lamela cu o lamă de bărbierit. Lama pe care se găsește preparatul este trecută în alcool absolut și peste preparat se pune o picătură de euparal, deasupra căreia se așază o lamelă curată și umectată cu alcool absolut. Dacă preparatele permanente se fac cu balsam de Canada, după scoaterea lamelor din alcool absolut, este necesar ca ele să fie trecute în xilol sau toluen, pentru cîteva minute. În cîteva zile preparatele se usucă și pot fi păstrate și studiate timp îndelungat.

O metodă ameliorată pentru studiul citologic al cromozomilor uriași constă în următoarele : glandele salivare sînt scoase și fixate în acid acetic 50 %, 3—5 minute, la 20—22°C. Apoi sînt puse pe o lamă de cuarț, într-o picătură de fixator, deasupra se pune o lamelă și se lovește ușor cu un ac spatulat, pentru a se separa celulele și a dispersa cît mai bine conținutul

lor. După aceea se trece cu un rulou de cauciuc peste lamelă şi cu o bucată de hîrtie de filtru se elimină excesul de fixator. Lamela se desprinde prin tehnica gheţii uscate. Peste material se pune o picătură de acetat de lantan în glicerină, preparat astfel : 5 % soluţie apoasă saturată de acetat de lantan şi 95 % glicerină (acetatul de lantan are rolul de a precipita acizii nucleici ca sare de lantan). Materialul se acoperă apoi cu o lamelă de cuarţ şi se lasă o noapte la 4—8°C, după ce în prealabil excesul de soluţie a fost eliminat şi lamela parafinată. Prin această metodă cromozomii se observă la microscopul cu contrast de fază.

5.4. Principalele mutante şi linii folosite în studiile de genetică

Morgan şi colab. (1925) au reuşit să identifice peste 500 de mutaţii care afectau toate organele *D. melanogaster*. Aceste mutante au servit ca un excelent material pentru studiul transmiterii ereditare a caracterelor la descendenţi, respectiv a mecanismului cromozomial al eredităţii. Genele se prezintă sub formă de perechi de alele din care una este dominantă şi se notează cu literă mare şi alta recesivă şi se notează cu literă mică. Se consideră că de la tipul ancestral „sălbatic" a apărut prin mutaţie un tip diferit de organism, iar genele care determină tipul sălbatic şi cel diferit au devenit astfel alele. Este vorba de o aceeaşi genă transformată prin procesul mutagen.

Genele alele se află în acelaşi locus pe cromozom. Dacă gena care determină tipul sălbatic se notează cu a^+ şi gena alelă cu a, aceasta înseamnă că tipurile homozigote sînt $a^+ a^+$ şi $a\ a$, iar cel heterozigot este $a^+ a$.

Fiecărei mutante* îi este atribuit un simbol reprezentativ, care constă din litera iniţială a denumirii : *e* pentru *ebony* (mutantă ce se caracterizează prin aceea că prezintă capul de culoare maron închis spre negru), sau din prima plus una sau mai multe litere din cuvîntul respectiv : *ey* — pentru mutanta *eyeless*, *dp* — pentru mutanta *dumpy*, *vg* — pentru vestigial etc.

Numele şi simbolul mutantelor dominante se pot nota în diferite moduri, cu literă mare : *Bar* = *B*, *Lobe* = *L*, cu semnul „+" sau cu literă mică şi semnul „+" (vg^+, e^+, w^+), mutantele recesive fiind notate în acest caz cu literă mică, *ebony* = *e*; *white* = *w*. Astfel, alela tipului sălbatic dominant de la mutanta *black* nu este *B* ci b^+, iar alela dominantă a tipului de la mutanta *Bar* (*B*) nu este *b* ci B^+. Cu „+" se notează tipul sălbatic, chiar în cazul unei mutante multiple, de exemplu *y w m*/+.

Genele alele sînt plasate într-un anumit locus pe cromozomii pereche, pe fiecare cromozom neputînd exista decît una dintre genele alele (*A* sau *a*). În unele cazuri există mai mult de două gene plasate în acelaşi locus, care determină variaţii ale aceluiaşi caracter. Fenomenul se numeşte polialelie şi este provocat de mutaţii consecutive ale unei gene dintr-un

* Iniţiala cu care se notează o genă, în general, provine de la denumirea, în engleză sau latină, a caracterului pe care-l determină. Fiecărei mutante i se atribuie un nume după caracterul care este afectat. Acesta este de obicei un simplu adjectiv : *black* (culoarea neagră a corpului) sau un substantiv ca de pildă *Bar* (ochii acestei mutante fiind reduşi la un segment).

anumit locus. Dacă tipul sălbatic este notat cu *A*, prin mutaţii succesive pot apărea o serie de alele ce se notează cu $a_1, a_2, a_3, \ldots a^n$ şi care afectează toate acelaşi caracter. Gena ce determină tipul sălbatic poate fi notată cu prima sau cu primele litere ale caracterului respectiv şi semnul plus (a^+), iar genele alele ale sale se notează cu aceeaşi literă la care se schimbă indicele (a^a, a^b, a^c etc.).

Iată cîteva mutante şi linii folosite frecvent în cercetările de genetică :

y = *yellow* (1—0) * mutantă cu corpul de culoare galbenă intens, perii fiind cafenii, cu vîrful galben.

w = *white* (1—1,5) are ochi de culoare albă ca zăpada; ocelii şi tuburile lui Malpighi incolori;

w^a = *white apricot* (1—1,5) prezintă ochi de culoare trandafirie-gălbuie la masculi şi ceva mai galbeni la femele ; tuburile lui Malpighi incolore.

v = *vermilion* (1—33,0) mutantă cu ochi de culoare roşie, foarte vie, ocelii incolori ; viabilitatea este satisfăcătoare.

f = *forked* (1—56,7) prezintă peri scurţi şi îndoiţi, bifurcaţi la vîrf.

m = *miniature* (1—36,1) are aripi mici, depăşind cu puţin abdomenul.

B = *Bar* (1—57,0) are ochi reduşi la un segment vertical, îngust la masculi şi femelele homozigote ; femelele heterozigote (*B*/+) au ochi în formă de rinichi sau boabe de fasole.

Cy = *Curly* (2) prezintă aripile îndoite în sus ; organismele homozigote (*Cy*/*Cy*) sînt letale.

dp = *dumpy* (2—13,0) mutantă ce se caracterizează prin forma şi mărimea aripilor : aripile sînt tăiate şi reduse la circa 2/3 din lungimea aripilor tipului sălbatic.

cn = *cinnabar* (2—57,5), ochii sînt colorati în roşu luminos ce capătă o tentă mai întunecată odată cu vîrsta.

vg = *vestigial* (2—67) prezintă aripi sub forma unor rudimente.

L = *Lobe* (2—72,0), ochii, reduşi ca mărime, au o uşoară lobare pe marginea anterioară ; în stare homozigotă determină o reducere accentuată a mărimii ochilor şi scăderea viabilităţii sau este letală.

bw = *brown* (2—104,5), culoarea ochilor este cafenie deschis la naştere şi se închide după mai multe zile ; vasele şi testiculele sînt incolore, iar tuburile lui Malpighi mai deschise la culoare în comparaţie cu ale tipului sălbatic. În caz că genele *cn*, *st*, *v* sînt prezente, indivizii prezintă ochi albi.

se = *sepia* (3—26,0) prezintă ochi de culoare roşie-cafenie transparentă la naştere, închizîndu-se pînă la sepia şi chiar negru.

e = *ebony* (3—70,7), culoarea corpului este neagră strălucitoare la adult, mult mai închisă decît a tipului sălbatic ; viabilitatea este apreciată la 0,8 din cea a tipului sălbatic, notată cu 1,0.

ey = *eyeless* (4—0,2), ochi reduşi la 1/2—1/4 din mărimea celor de la tipul sălbatic sau sînt lipsite complet de ochi.

Linia *Curly Lobe Plum* se utilizează pentru identificarea mutantelor letale recesive, legate de autozomi. Pe cromozomul 2 prezintă concomitent 3 mutaţii : *Curly* (*Cy*), genă dominantă ce determină ca indivizii să pre-

* Prima cifră din paranteză indică numărul cromozomului pe care este plasată gena, iar a doua poziţia locusului în unităţi de recombinare.

zinte aripile îndoite în sus, *Lobe* (*L*), genă dominantă ce determină forma lobată a ochilor, și *Plum* (*Pm*), genă dominantă ce determină culoarea brunie a ochilor. Deoarece tipul homozigot este letal, toți indivizii sînt heterozigoți (*Cy* + *L*/ + *Pm* +), menținîndu-se astfel de-a lungul generațiilor.

Linia *Muller 5*, obținută de Muller și utilizată pentru detectarea mutațiilor letale sau a celor recesive apărute pe cromozomul X, este alcătuită din mutante ce prezintă ochi de culoare *apricot* (caisei) w^a w^a și barați (*B B*), mutante determinate de gene plasate pe cromozomul X, împreună cu o inversiune ce elimină posibilitatea crossing-overului.

Linia *ClB*, sintetizată de Muller pentru evidențierea mutantelor recesive și letale legate de cromozomii sexului. Un cromozom X posedă o inversiune care împiedică crossing-overul între cromozomii X. Inseparabil de inversiunea *C* se află și o genă (*l*) recesivă, care-și exercită acțiunea letală în stare homozigotă, fiind mascată în stare heterozigotă, și gena dominantă *B* ce determină ochi barat și care indică prezența cromozomului Cl, putînd fi recunoscuți indivizii ce posedă acest cromozom.

Linia *Curly Lobe Glazed* (*Cyl/Gla*), la care genele sînt plasate pe cromozomii perechii a doua. Gena *Curly* (*Cy*), dominantă, determină îndoirea aripilor de sus, *Lobe* (*L*), genă dominantă, determină apariția ochilor lobați, *Glazed* (*Gla*) ochii sînt sticloși și au o culoare vișinie mai închisă decît tipul sălbatic.

5.5. Analiza genetică

5.5.1. Monohibridarea

În cazul monohibridării, genitorii se deosebesc printr-o singură pereche de caractere. Pentru efectuarea acestui tip de încrucișare se recomandă să se folosească insecte de tip sălbatic ce prezintă aripi de tip normal și mutanta vestigial. Înainte de începerea experiențelor trebuie efectuate încrucișări în interiorul fiecărui tip ales, pentru a verifica constanța caracterelor. Încrucișările și observațiile trebuie efectuate în decursul mai multor generații.

Iată cîteva exemple de monohibridări:

1. Tipul sălbatic, cu aripi normale (vg^+ vg^+) × *vestigial*, aripi *vestigiale* (*vg vg*)
2. Tipul sălbatic (dp^+ dp^+) × *dumpy*, aripi *trunchiate* (*dp dp*)
3. Tipul sălbatic, cu ochi roșii (se^+ se^+) × *sepia*, ochi *sepia* (*se se*)
4. Tipul sălbatic, cu corpul normal (e^+ e^+) × *ebony*, corp de culoare neagră (*e e*).
5. Tipul cu ochii roșii (w^+w^+) × *white*, ochi albi (*w w*).

Se aleg 5—6 perechi de insecte, care constituie genitorii. Se efectuează împerecherile propriu-zise, introducînd în același vas de cultură masculii și femelele virgine, apoi se etichetează vasele. După 7—8 zile, timp suficient pentru depunerea unui număr mare de ouă, genitorii se transferă într-un alt vas de cultură, de rezervă, sau se îndepărtează.

Noua generație care rezultă din această încrucișare constituie generația întîia (F_1), care este hibridă, toți indivizii rezultați sînt de tip sălbatic

(cu aripile normale), fiind însă heterozigoți. La acești indivizi care posedă ambii factori ereditari nu se manifestă decît unul dintre ei, cel dominant (în cazul experienței noastre, forma normală a aripii), celălalt, aripi vestigiale, rămîne în stare ascunsă, fiind recesiv. În F_2 segregarea după fenotip este de 3 părți de tip sălbatic, normale, și 1 parte de tip vestigial.

Pentru obținerea generației a doua (F_2) se procedează astfel: se iau 5—6 perechi de insecte heterozigote din F_1 și se introduc în vase de cultură cu mediu proaspăt. În acest caz nu este necesar ca femelele să fie virgine, deoarece toate insectele sînt asemănătoare, fiind heterozigote. Insectele sînt lăsate 6—7 zile în vase, după care sînt îndepărtate. Cînd apare F_2, se efectuează numărătorile, timp de 7—8 zile. Datele obținute se înscriu într-un tabel. Pentru a vedea dacă această segregare are un caracter pur întîmplător sau este vorba de o legitate a segregării, se aplică *testul hi pătrat* (χ^2).

Prin autofecundarea generației a doua se obține generația a treia (F_3), la care se observă că din insectele de tip vestigial se obțin exclusiv insecte de acest tip. Prin autofecundarea insectelor de tip sălbatic, cu aripi normale, în F_3 se întîlnesc două posibilități:

— în cazul în care se obțin exclusiv insecte cu aripi normale se poate deduce că genitorii în F_2 au fost homozigoți;

— dacă are loc segregarea în raport de 75% insecte cu aripi normale și 25% insecte de tip vestigial, înseamnă că genitorii în F_2 au fost heterozigoți, dar fenotipic prezentau aripi normale, caracter determinat de o genă dominantă. Deci insectele heterozigote în F_2 se comportă în F_3 la fel cum se comportă hibrizii din prima generație.

5.5.2. Retroîncrucișarea (back-cross)

Insectele heterozigote din F_1 se încrucișează cu genitorii homozigoți, realizîndu-se astfel retroîncrucișarea. Astfel, femele virgine din F_1 pot fi împerecheate cu masculi de tip vestigial sau femele virgine de tip vestigial cu masculi din F_1. În fiecare vas de cultură cu mediu proaspăt pregătit se pun 5—6 perechi de insecte. După 6—7 zile, genitorii se îndepărtează. Cînd apar insectele se stabilește cîte sînt de tip sălbatic și cîte de tip vestigial. Aceste calcule se efectuează timp de 7—8 zile, iar datele obținute se înscriu într-un tabel. Dacă insectele hibride din F_1 se împerechează cu insectele de tip sălbatic (back-cross) în F_2 se obțin numai insecte cu aripi normale, din care 50% homozigote și 50% heterozigote. Din contră, dacă insectele heterozigote din F_1 se împerechează cu insecte de tip vestigial, în F_2 jumătate din insecte sînt cu aripi normale, dar heterozigote, și jumătate cu aripi vestigiale, fiind homozigote.

5.5.3. Dihibridarea

Prin metoda încrucișărilor dihibride se poate demonstra modul cum se transmit caracterele, cînd organismele se deosebesc prin două perechi de caractere.

Pentru încrucișări dihibride folosim mutante ce se deosebesc prin două perechi de caractere: *vestigial*, mutantă determinată de o genă plasată pe cromozomul 2, caracterizată prin aripi foarte mici și corp normal colorat, și mutanta *ebony*, determinată de o genă de pe cromozomul 3 ce prezintă corpul de culoarea abanosului (maron închis spre negru) și aripi normal dezvoltate. Hibrizii din prima generație proveniți din părinți ce se deosebesc prin două perechi de caractere formează patru tipuri de gameți femeli și patru tipuri de gameți masculi. Prin combinarea acestor gameți rezultă 16 combinații, care reprezintă segregarea în cazul încrucișării părinților ce se deosebesc prin două perechi de caractere, ce se realizează astfel — 9 : 3 : 3 : 1.

Pentru efectuarea acestui tip de încrucișare se stabilesc caracterele care urmează să fie studiate, se aleg genitorii, avînd grijă ca femelele să fie virgine, și se efectuează împerecherile. După 6—7 zile se îndepărtează genitorii sau se transferă într-un vas cu mediu proaspăt, apoi se iau cîteva perechi de insecte hibride din F_1, care se împerechează. După apariția insectelor se efectuează calculele, iar rezultatele se centralizează într-un tabel.

5.5.4. Încrucișări trihibride

În acest tip de încrucișare, organismele se deosebesc prin trei perechi de caractere. Se pot folosi insecte din linia *brown — ebony — eyeless* (*bw e ey/bw e ey*), care se încrucișează cu insecte de tip sălbatic (+++/+++). Insectele din F_1 (femele și masculi) după fenotip sînt normale, dar heterozigote (*bw e ey*/+++), și formează 8 tipuri de gameți femeli și 8 tipuri de gameți masculi: +++; ++ *ey*; +*e* +; *bw* ++; +*e ey*; *bw*+*ey*; *bw e* +; *bw e ey*. Prin unirea pe bază de hazard a acestor gameți, se formează 64 de combinații și 8 tipuri de organisme:

1) 27/64 normale (cu trei caractere dominante: +++).

2) 9/64 *brown* (cu două caractere dominante și unul recesiv, *bm* ++).

3) 9/64 *ebony* (cu două caractere dominante și unul recesiv, + *e* +).

4) 9/64 *eyeless* (cu două caractere dominante și unul recesiv, ++ *ey*).

5) 3/64 *brown-ebony* (cu un caracter dominant și două recesive, *bw e* +).

6) 3/64 *brown-eyeless* (cu un caracter dominant și două recesive, *bw* + *ey*).

7) 3/64 *ebony-eyeless* (cu un caracter dominant și două recesive, *e* + *ey*).

8) 1/16 *brown-ebony-eyeless* (cu trei caractere recesive, *bw e ey*).

Pe baza acestor experiențe se poate verifica cea de-a doua lege a lui Mendel: legea liberei combinări a factorilor ereditari sau legea segregării independente a perechilor de caractere. Conform acestei legi, factorii ereditari pereche (alele) segregă independent de alți factori ereditari și prin combinarea lor, pe bază de probabilitate, raportul de segregare în F_2 este de 9 : 3 : 3 : 1, în cazul a două perechi de caractere, și de 27 : 9 : 9 : 9 : 3 : 3 : 3 : 1 în cazul a trei perechi de caractere.

5.6. Interpretarea matematică a rezultatelor încrucișărilor experimentale

O problemă foarte importantă privind legile mendeliene ale segregării este următoarea: care este probabilitatea ca în cazul repetării lor să se obțină rezultate similare. Mendel, pentru a da un răspuns acestei probleme, a aplicat calculul probabilităților la interpretarea rezultatelor sale experimentale.

Iată un exemplu la *D. melanogaster*, în cazul unei încrucișări între indivizi deosebiți prin două perechi de caractere. În F_2, aproximativ 3/4 din insecte erau de tip sălbatic (795/1061) și aproximativ 1/4 de tip *vestigial* (266/1061). În privința culorii corpului s-a observat că 3/4 (783/1061) erau maron deschis și 1/4 (278/1061) maron închis (*ebony*). Aceasta arată că cele două perechi de caractere segregă independent una de alta. Dacă se iau în considerație ambele perechi de caractere, rezultatele dovedesc că sînt conforme cu modelul matematic prin care două fenomene independente acționează împreună.

Pe baza calculului probabilităților șansa combinării a două fenomene independente este egală cu produsul probabilității lor separate. Astfel, 9/16 (3/4 × 3/4) din insecte vor fi de tip sălbatic, 3/16 (1/4 × 3/4) cu aripi *vestigiale* și corp maron deschis (tip săbatic), 3/16 (1/4 × 3/4) cu aripi normale și corp maron închis (*ebony*) și 1/16 (1/4 × 1/4) *vestigial* și *ebony*. Deci segregarea în F_2 trebuie să se facă în raport 9 : 3 : 3 : 1.

În experiențe s-au obținut următoarele rezultate: 594 normale, 196 *vestigial*, 200 *ebony* și 71 *vestigial-ebony*. Pentru a vedea dacă această segregare are un caracter pur întîmplător sau este vorba de o legitate a segregării, se poate aplica testul hi pătrat (χ^2) pentru a compara distribuția teoretică a fenomenelor cu cea experimentală.

Formula pentru testul hi pătrat este următoarea:

$$\chi^2 = \Sigma \frac{d^2}{e}$$

în care: Σ = semnul de însumare,

d^2 = diferența dintre valoarea calculată și cea observată,

e = valoarea calculată a fenomenului.

Cercetările de statistică matematică au dus la apariția unei metode pentru estimarea probabilității de repetare a fenomenului în cazul unor valori diferite ale testului hi pătrat. În acest scop, se folosesc tabelele lui Fisher, care indică, în procente, probabilitatea pentru valorile lui χ^2, ținînd seama de numărul de grade de libertate care este egal cu numărul de clase independente de indivizi minus unul. În cazul nostru, numărul de clase de indivizi apărute în urma segregării este egal cu 4, iar al gradelor de libertate este egal cu 3. Valoarea lui χ^2, de 0,378 în cazul nostru, în tabelele lui Fisher este cuprinsă între 0,35 și 0,58, adică între probabilitățile P = 0,90 și P = 0,95.

Se poate deci spune că în cazul repetării experienței se vor obține rezultate similare în 90—95% din cazuri, aceasta însemnînd, în mod sigur, că ipoteza inițială că segregarea a două perechi de caractere plasate pe cromozomi diferiți în raport de 9 : 3 : 3 : 1 este adevărată.

5.7. Evidențierea fenomenului de înlănțuire a genelor (linkage)

Studiul celor peste 500 de mutante de la *D. melanogaster* a dus la constatarea nu numai că genele trebuie să fie plasate în cromozom, dar că, ținînd seama de numărul mare al genelor și numărul redus al cromozomilor, mai multe gene trebuie să fie plasate în același cromozom. Concluzia este că pe fiecare cromozom există un număr mai mare de gene și că acestea se transmit împreună înlănțuite, la descendenți.

Prin încrucișarea unei insecte (♀) de tip sălbatic cu o insectă (♂) care prezintă două mutații recesive (aripi vestigiale și ochi purpurii) trebuia să se obțină, conform legilor lui Mendel, 4 tipuri de indivizi : 1) tip sălbatic, 2) cu aripi normale și ochi purpurii, 3) cu aripi vestigiale și ochi normali și 4) cu aripi vestigiale și ochi purpurii, în proporție de 9 : 3 : 3 : 1. În locul acestora, în F_2 s-au obținut numai două tipuri de indivizi : 1) sălbatic și 2) cu aripi vestigiale și ochii purpurii, în proporție de 519 : 552. Acest lucru se datorește plasării celor două gene (care determină caracterele de ochi purpurii și aripi vestigiale) pe același cromozom și se transmit împreună. Acest fenomen se numește *linkage* (înlănțuire).

Pentru demonstrarea acestui fenomen se procedează astfel : se împerechează, de pildă, insecte de tip sălbatic cu insecte ce prezintă două mutante recesive (*black* și *vestigial*), determinate de gene ce sînt plasate pe cromozomul 2. Se lasă împreună 7—8 zile pentru a depune un număr suficient de ouă, după care se transferă în alt vas de cultură sau se îndepărtează.

După apariția F_1 se efectuează observațiile. Se fac încrucișări între femele virgine din F_1 (heterozigote) și masculi ce prezintă ambele mutante (*black* și *vestigial*) și femele dublu mutante cu masculi F_1.

După apariția insectelor din F_2 acestea se analizează și se grupează ținînd seama de fenotip, iar rezultatele se interpretează statistic.

5.8. Evidențierea fenomenului de interacțiune a genelor

Interacțiunea genelor este un fenomen ce determină modificarea tipului mendelian de segregare sau apariția la descendenți a unor fenotipuri ce nu au existat la genitori.

Pentru evidențierea fenomenului se încrucișează insecte de tip *black*, caracter determinat de o genă plasată pe cromozomul 2, cu mutanta *ebony*, determinată de o genă ce se găsește pe cromozomul 3. Prin încrucișarea insectelor din F_1 heterozigote ($b+/+e$) se obține F_2 în care raportul de segregare este de 9 insecte de tip sălbatic la 7 insecte cu corpul negru.

Aceasta arată că raportul mendelian de segregare în cazul a două perechi de caractere de 9 : 3 : 3 : 1 s-a modificat în 9 : 7, datorită faptului că fenotipic clasele de indivizi 3/16 + 3/16 + 1/16 (*black*, *ebony* și *black-ebony*) sînt identice, avînd corpul negru.

Datorită fenomenului de interacțiune a genelor în F_2 pot apărea și alte tipuri de segregare. Astfel, dacă în încrucișarea precedentă se ia în considerație încă o genă, care se referă la culoarea corpului, cu o acțiune asemănătoare genelor *black* și *ebony*, în clasa insectelor închise la culoare vor fi incluse toate noile combinații ce rezultă în urma încrucișării trihibride. Ca urmare, raportul tipic mendelian de segregare 27 : 9 : 9 : 9 : 3 : 3 : 3 : 1 se reduce la 27/64 insecte normale (corp cenușiu) : 37/64 insecte închise la culoare.

Prin încrucișarea unor insecte mutante *Lobe* și *eyeless*, determinate de gene ce se găsesc plasate pe cromozomul 2, respectiv pe cromozomul 4, segregarea în F_2 se deosebește esențial de tipul mendelian. Din prezentarea schematică a acestei încrucișări se observă că 3 clase din 16 (care nu prezintă gena dominantă *Lobe* și nici gena *eyeless* în stare homozigotă) au ochi normali și nereduși. Toate celelalte clase (13 din 16) prezintă gena *Lobe* în stare homozigotă și heterozigotă, sau gena *eyeless* în stare homozigotă și, ca urmare, vor prezenta ochi reduși ca mărime. Raportul de segregare mendelian 9 : 3 : 3 : 1, reprezentat prin 4 fenotipuri, se reduce la două : 13/16 (ochi reduși) și 3/16 (ochi normali). Se poate ușor observa că dacă gena *eyeless* ar fi dominantă numai 1 din 16 combinații va avea ochi normali, iar raportul de segregare s-ar modifica în 1 : 15.

Interacțiunea genelor determină nu numai modificarea raportului mendelian de segregare, ci și apariția unor fenotipuri noi, deosebite de ale genitorilor. Prin încrucișarea a două mutante : *brown*, determinată de o genă localizată pe cromozomul 2, și *vermilion*, genă plasată pe cromozomul 1, în F_1 toate insectele prezintă ochi roșii, fiind deosebiți de ai genitorilor (*brown*, respectiv *vermilion*). În F_2 ar trebui, în mod normal, în cazul acestei încrucișări ($br+/+v$), să apară 4 combinații, în raport de 1 : 2 : 1 (1 ochi roșii, 2 ochi cafenii, 1 ochi vermilion). În realitate, pe lîngă aceste 3 tipuri au apărut și insecte cu ochi albi, iar segregarea s-a produs în raport de 9 : 3 : 3 : 1, apărînd și fenotipuri noi (ochi albi și ochi roșii) ce nu se întîlnesc la genitori.

Fenotipic, F_2 se prezintă astfel : 9/16 insecte cu ochi roșii ; 3/16 insecte de tip vermilion (ochi colorați în roșu deschis) ; 3/16 insecte de tip brown (ochi cafenii) și 1/16 insecte cu ochi albi. Din acest exemplu reiese că din interacțiunea celor două gene în stare dominantă apare un nou tip de insecte (de tip sălbatic cu ochi roșii), iar din interacțiunea celor două gene în stare recesivă apar insecte cu ochi albi, ambele tipuri deosebindu-se de genitori.

Din punct de vedere biochimic, fenomenul de interacțiune a genelor, în cazul expus, poate fi explicat astfel : culoarea ochilor este determinată de prezența unor pigmenți și copigmenți. Pe lîngă aceștia, sînt două gene dominante, A și B, care controlează diferite etape din lanțul procesului biochimic ce determină apariția culorii roșii. Absența oricăreia dintre cele două gene dominante are ca rezultat blocarea lanțului proceselor biochimice care duc la apariția culorii și, ca urmare, ochii rămîn albi.

5.9. Evidenţierea fenomenului de crossing-over

Studiul mecanismului de transmitere ereditară a caracterelor a arătat că nu întotdeauna genele ce fac parte din aceeaşi grupă de linkage se transmit înlănţuite, ci există o serie de excepţii. Pentru explicarea acestor excepţii s-a ajuns la concluzia că între cromozomii pereche are loc un schimb reciproc de gene, adică o recombinare genetică, fenomen care a primit denumirea de crossing-over. Cercetările experimentale au confirmat justeţea acestei ipoteze.

Prin încrucişarea unei femele de *D. melanogaster* ce prezintă concomitent două mutaţii recesive : corp galben (*y*) şi ochi albi (*w*), determinate de gene plasate pe cromozomii *X* (*y w*) X (*y w*), cu un mascul cu corp gri şi ochii roşii X(y^+ w^+) Y, în F_1 s-au obţinut : femele de tip sălbatic, dar heterozigote (X(*y w*) X(y^+w^+)), şi masculi ce prezentau ambele mutante X(y *w*)Y. Prin încrucişarea indivizilor din F_1 s-a obţinut F_2 în care indivizii erau reprezentaţi ca în tabelul nr. 21.

Tabelul nr. 21

Rezultatele încrucişării în F_2

♀ \ ♂	X (y w)	Y
X(y w)	X(y w) X(y w) 49,25%	X(y w)Y 49,25%
X(y^+ w^+)	X(y^+w^+) X(y w) 49,25%	X(y^+w^+)Y 49,25%
X(y w^+)	X(y w^+)X(y w) 0,75%	X(y w^+)Y 0,75%
X(y^+ w)	X(y^+ w) X(y w) 0,75%	X(y^+ w) Y 0,75%

În mod normal trebuia să rezulte în proporţii egale femele şi masculi cu corp galben şi ochi albi 50%, corp gri şi ochi roşii 50%. Din tabel rezultă că au apărut însă în proporţii reduse (1,5%) femele şi masculi cu corp galben şi ochi roşii sau corp gri şi ochi albi. Aceasta înseamnă că între genele *y* şi y^+ şi între genele *w* şi w^+ s-a produs o recombinare, datorită faptului că genele *y w* plasate pe un cromozom X şi genele y^+w^+ plasate pe celălalt cromozom X nu s-au transmis înlănţuite, ci s-au separat una de alta. Astfel, în loc ca descendenţii să fie de tip sălbatic sau să prezinte concomitent două mutaţii au apărut şi indivizi la care cele două gene *y w* s-au separat şi prezentau o singură mutaţie (corp galben sau ochi albi).

Fenomenul de crossing-over se manifestă şi la genele de pe autozomi.

S-a studiat modul de transmitere ereditară a caracterelor la două mutante, ale căror gene erau plasate pe perechea a doua de cromozomi, una cu aripi vestigiale (*vg*) şi corp normal colorat (b^+) şi alta cu aripi normale (vg^+) şi corp negru (*b*). Prin încrucişarea femelei vg^+b/vg^+b cu un

mascul $vg\ b^+/vg\ b^+$ în F_1 au apărut numai indivizi de tip sălbatic (aripi normale şi corp colorat normal, fiind caractere dominante). O femelă din F_1 a fost retroîncrucişată cu un mascul ce prezintă ambele mutante (aripi vestigiale şi corp negru, *vg b/vg b*).

În mod normal trebuia să rezulte în proporţii egale indivizi cu aripi vestigiale şi corp normal (50%) şi aripi normale şi corp negru (50%). Au rezultat însă 41,5% indivizi cu aripi vestigiale şi corp normal ; 41,5% cu aripi normale şi corp negru ; 8,5% cu aripi vestigiale şi corp negru şi 8,5% cu aripi şi corp normale. Apariţia acestor ultime categorii de indivizi se datoreşte unui fenomen de recombinare genetică datorită schimbului de gene între cromozomii pereche.

5.10. Evidenţierea fenomenului de sex-linkage

Studiul mecanismului cromozomial al determinării sexelor a permis descoperirea faptului că unele caractere se transmit la descendenţi legate de un anumit sex (fenomenul sex-linkage).

Morgan şi colab. (1925), studiind numeroase mutante la *D. melanogaster*, au descoperit un mascul cu ochi albi, caracter determinat de o genă recesivă (*w*) care se deosebea considerabil de tipul sălbatic cu ochii roşii (w^+). Din încrucişarea masculului cu ochii albi cu femele de tip sălbatic, în F_1 au rezultat exclusiv descendenţi cu ochi roşii (caracter dominant), iar în F_2 s-a produs segregarea în 3/4 (ochi roşii) şi 1/4 (ochi albi). S-a constatat însă că toţi indivizii din F_2 cu ochi albi erau masculi. Pe baza acestei constatări s-a încercat experimental obţinerea unor femele cu ochi albi. În acest scop au fost încrucişate femele cu ochi roşii heterozigote (w^+w) din F_1 cu masculi cu ochi albi (back-cross) rezultînd, aşa cum era de aşteptat în asemenea încrucişări, 50% indivizi cu ochi roşii, dintre care 1/2 femele şi 1/2 masculi, şi 50% indivizi cu ochi albi, dintre care 1/2 femele şi 1/2 masculi.

Din aceste experienţe s-a tras concluzia că gena *w* ce determină caracterul de „ochi albi" este plasată pe cromozomul X, întrucît transmiterea sa din generaţie în generaţie urmează calea transmiterii cromozomului X, provenit de la organismul cu ochi albi. Deoarece cromozomul X determină şi sexul, este vorba de un fenomen de transmitere ereditară a unui caracter legat de cromozomii sexului (sex-linkage).

6 Metode de inducere și de identificare a mutațiilor

Mutațiile, definite de Mayer (1963) ca „modificări discontinue cu efect genetic", pot fi clasificate în : *mutații genice*, cînd afectează genele, *mutații cromozomiale*, cînd afectează cromozomii, și *mutații genomice*, în cazul că întreg genomul este afectat.

Mutațiile sînt induse de o mare varietate de *agenți mutageni naturali* (radiația cosmică, radiațiile emise de unele elemente radioactive din sol, variațiile bruște de temperatură etc.) sau *artificiali* (fizici, chimici și biologici). Drake (1970) clasifică leziunile produse de agenții mutageni în *microleziuni* în care sînt incluse mutațiile punctiforme care afectează o singură pereche de nucleotide din macromolecula de ADN și *macroleziuni* care afectează un segment cromozomial și pot fi detectate citologic.

Identificarea mutațiilor este dificilă, din cauza faptului că majoritatea sînt recesive. Astfel, în timp ce mutațiile dominante pot fi ușor depistate deoarece se manifestă fenotipic, indiferent dacă sînt în stare homo- sau heterozigotă, mutațiile recesive se manifestă fenotipic numai în stare homozigotă. De aceea, toate metodele de identificare a mutațiilor recesive se bazează pe aducerea genelor mutante în stare homozigotă în F_2, F_3 etc.

La organismele haploide (bacterii, drojdii etc.), mutațiile pot fi identificate direct prin fenotipul pe care-l manifestă. La acestea relațiile de dominanță și recesivitate se referă numai la nivel de populație.

Factorii care influențează efectul mutagen. În prezent este cunoscută o gamă largă de agenți mutageni fizici (radiații ionizante și neionizante, șocuri de temperatură etc.), chimici (agenți alkilanți, analogi ai bazelor azotate, coloranți, unele antibiotice etc.) și biologici (unele virusuri etc.), al căror efect mutagen este influențat de numeroșii factori din mediul intern sau extern. Diferite tipuri de organisme și, în cadrul aceluiași organism, diferite celule și țesuturi au o sensibilitate variată. În afară de această sensibilitate, o serie de alți factori condiționează rezultatele genetice ale agenților mutageni : doza, timpul de tratament, tipul agentului mutagen, oxigenul, umiditatea, temperatura, pH-ul și unele substanțe chimice. S-a constatat că prin iradieri succesive efectul se cumulează, dacă între ele nu este un interval prea mare.

Dintre factorii de mediu care influențează frecvența mutațiilor cel mai eficient s-a dovedit oxigenul ; efectul mutagen al radiațiilor ionizante crește proporțional cu cantitatea de oxigen. Gilles și colab. (1956) au

dovedit că prezența oxigenului mărește numărul de aberații cromozomiale, fiind eficient mai ales dacă se află în celulă în timpul iradierii. Oxigenarea celulei înainte sau după iradiere nu are nici un efect.

Caldecott și colab. (1961) au studiat acțiunea razelor X și a neutronilor termici și rapizi asupra semințelor de orz, în condițiile unei atmosfere îmbogățite cu oxigen, constatînd creșterea sensibilității la razele X. S-a observat, de asemenea, că efectul iradierii crește odată cu sporirea conținutului de apă în țesuturi. Gustafsson (1941) și Caldecott (1961) au constatat o creștere a ratei mutațiilor în cazul iradierii cu raze X a semințelor îmbibate cu apă.

Mortimer (1961) a evidențiat că răspunsul celulelor de drojdii la radiații depinde de faza ciclului de diviziune și de gradul de ploidie. Celulele în diviziune sînt mai rezistente decît cele din faza staționară ; rezistența este mai mare în perioada de înmugurire. Celulele haploide prezintă o întîrziere în refacerea de după iradiere, ilustrată de apariția unor colonii noi din celulele iradiate după 5—6 zile de la iradiere ; celulele haploide care au supraviețuit au dezvoltat colonii în două zile. Radiorezistența a crescut de la haploizi la diploizi și a scăzut de la triploizi la tetraploizi. De asemenea s-a demonstrat că radiorezistența este controlată genetic.

S-a dovedit experimental că temperatura și pH-ul influențează procesul mutațional. Zimmermann, Schwaier și von Laer (1966) au constatat că prin incubarea celulelor tratate cu acid nitros și diferite N-alkilnitrozamide la 25°, 30° și 35°C, procentul celulelor care au supraviețuit este aproximativ egal la 25° și 30° și mai scăzut la 35°C. Frecvența mutațiilor este mai mare la 25°C și mai mică la 35°C.

În privința influenței pH-ului asupra supraviețuirii celulelor și frecvenței mutațiilor, s-a observat că unele N-alkilnitrozamide induc mutații cu o frecvență mare la un pH ridicat, iar altele la pH scăzut. Astfel, Zimmermann și Schwaier (1966) au arătat că N-nitrozo-N-metilacetamida are efect mutagen la pH 4,5, N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidina la pH 4,2 ; la pH 8,9 ultima devine inactivă.

6.1. Metode de inducere a mutațiilor la microorganisme

Inducerea mutațiilor cu ajutorul radiațiilor ultraviolete impune următoarele condiții :

— să se asigure o compoziție constantă a mediilor în care are loc iradierea, lipsite de substanțe sensibilizatoare sau protectoare și fără capacitate de fotoreactivare ;

— să se asigure o sursă de energie, cu lungimea de undă de maximă eficiență (2 580Å). Emisia se calculează în ergi/mm²/s ;

— să se stabilească doza de iradiere în funcție de parametrii lămpii și ai speciei cu care se experimentează.

În prima etapă se stabilește curba de supraviețuire a tulpinii luată în studiu. Se apreciază că cea mai bună doză este cea care asigură supraviețuirea a 27—30% din populația de celule.

Tehnica de lucru. Se folosește o cultură de microorganisme (bacterii, alge, ciuperci) aflată în fază staționară.

— Cultura se spală de două ori în soluție tampon fosfat de potasiu. După fiecare spălare se centrifughează, 10 minute, la 4 000—5 000 rpm.

— Sedimentul se resuspendă în soluție tampon fosfat de potasiu.

— Se calculează densitatea populației de celule cu ajutorul soluției etalon ($1{,}5 \cdot 10^9$) (în cazul bacteriilor) sau cu camera Thomas (în cazul algelor și ciupercilor microscopice).

— Suspensiile se transferă în vase Petri și se supun acțiunii radiațiilor ultraviolete, în doze ce se stabilesc în funcție de curba de supraviețuire și de timpul de iradiere. Cantitatea suspensiei în fiecare vas se apreciază în funcție de suprafața plăcii și durata de expunere la acțiunea UV (se evită durata mare de expunere ce poate duce la uscarea tulpinii respective). Manipularea vaselor Petri în timpul expunerii la UV se face cu atenție, ochii experimentatorului fiind protejați cu ochelari speciali. Iradierea se realizează pentru același timp de expunere pe mai multe plăci paralele, în boxă sterilă, vasul cu suspensie aflîndu-se la o distanță de 30—40 cm față de sursa de iradiere. După iradiere, vasele cu suspensie se acoperă cu hîrtie neagră (dacă se iradiază vasele Petri însămînțate, acestea se introduc imediat după iradiere în cutii metalice).

— Se pregătesc diluții seriate (1/10, 1/100) astfel ca prin însămînțarea a 0,1 ml în fiecare vas Petri să se dezvolte circa 200 de colonii. Din aceeași probă se însămînțează mai multe vase, iar însămînțarea se face pe medii selective, paralel cu însămînțarea pe mediu complet. De exemplu, dacă experiența vizează obținerea unor mutante rezistente la tetraciclină, suspensiile, în diluțiile corespunzătoare, se însămînțează în paralel pe plăci cu mediu nutritiv și pe plăci cu mediu nutritiv plus factorul de selecție (tetraciclina). Se analizează plăcile după incubare și se determină frecvența de apariție a mutațiilor.

— Se introduc la incubator, la 37°C pentru bacterii sau 30°C pentru alge și ciuperci microscopice. După 25 de ore (bacterii) sau în momentul formării coloniilor (alge, ciuperci) se calculează supraviețuirea și procentul de mutații ce au apărut în cazul fiecărei doze. Identificarea și izolarea mutațiilor se fac prin tehnici specifice.

Într-o populație de bacterii, de drojdii sau de alge expusă acțiunii radiațiilor UV fiecare celulă prezintă o anumită probabilitate de a supraviețui la o anumită doză. Dacă această probabilitate este de 0,1 atunci 10% din populație va supraviețui dozei respective. Printre supraviețuitori, fiecare celulă va avea din nou aceeași probabilitate de supraviețuire la o a doua doză similară. Prin dublarea dozei, procentul de supraviețuire va fi de 1% (produsul probabilităților separate $0{,}1 \times 0{,}1$). Dacă se reprezintă grafic numărul de supraviețuitori, raportat la timpul de iradiere sau doză, se obține o curbă exponențială, în timp ce logaritmul numărului de supraviețuitori în raport de curba supraviețuirii rezultată va fi o linie dreaptă. Panta curbei de supraviețuire reflectă modalitatea în care radiațiile UV acționează asupra celulelor, acțiunea fiind dependentă de densitatea suspensiei, natura lichidului de suspensie, de starea fiziologică a celulelor. Într-o suspensie densă de bacterii, unele celule sînt protejate de altele, iar curba de supraviețuire devine concavă în sus. În practică, apărarea nu este un factor important pentru suspensia care conține sub

$1 \cdot 10^8$ celule/ml. Mediul nutritiv absoarbe mai mult radiațiile UV decît soluțiile tampon apoase, așa încît doza efectivă pentru bacteriile suspendate în mediu este redusă. De asemenea, peroxizii toxici pot fi produși în mediu iradiat, ceea ce va prelungi efectul iradierii după încetarea acesteia.

În doze scăzute, curba de supraviețuire pentru populații constituite din celule dinucleate va avea totuși un platou datorită faptului că probabilitatea ca fiecare nucleu din celulele multinucleate să primească o doză letală este mai scăzută și cele mai multe vor supraviețui. La doze crescute, majoritatea celulelor vor primi o cantitate mai mare de radiații UV iar curba de supraviețuire va deveni exponențială.

Stabilirea curbelor de supraviețuire postiradiativă a microorganismelor. Experiențele de inducere a mutațiilor cu radiații sau cu substanțe chimice mutagene sînt precedate de experiențe de stabilire a curbelor de supraviețuire a microorganismelor luate în studiu. Pentru aceasta se folosesc spectre largi de doze sau concentrații ale substanțelor mutagene deoarece datele din literatură sînt numai orientative, efectul mutagen fiind dependent de numeroși factori interni și externi. Pentru stabilirea sensibilității celulelor față de agentul mutagen se procedează în felul următor:

— Se folosește o cultură de *Escherichia coli* K_{12}, nelizogenă pentru fagul lambda (λ). Se recomandă folosirea unei lămpi care dă o lumină uniformă, avînd aproximativ 91% din emisie de 2 580 Å, intensitatea fiind calculată în ergi/mm²/s. Calculul dozei se poate face și prin măsurarea inactivizării bacteriofagului T_2 sau a bacteriei *E. coli*. Se consideră că 50 ergi/mm² inactivează aproximativ 90% din particulele T_2, 100 ergi/mm² inactivează aproximativ 99% din particulele T_2, iar 500 ergi/mm² inactivează aproximativ 99% dintr-o linie lizogenică de *E.coli* K_{12}.

— Se aprinde lampa de ultraviolete cu o oră înainte de a fi folosită pentru a stabiliza emisia și se așază la 50 cm deasupra mesei de lucru.

— Cultura ajunsă în faza logaritmică de creștere se centrifughează 15 minute, la 5 000 rpm, folosind o centrifugă cu răcire. După îndepărtarea supernatantului, celulele sînt spălate de două ori cu soluție tampon fosfat de potasiu (pH 7) și sînt resuspendate în 25 ml soluție tampon. Cele două suspensii se introduc în vase de 100 ml și se aduc la concentrația de $1 \cdot 10^8$ bacterii/ml. Suspensiile se transferă în vase Petri cu diametrul de 10 cm, un timp variabil, la temperatură constantă și în condiții de agitare permanentă.

— Se pregătesc suspensii în apă bidistilată și după calcularea frecvenței celulelor se însămînțează circa 200 celule/vas Petri. Diluțiile și însămînțarea se efectuează la lumină roșie, pentru a evita fotoreactivarea. Se introduc în incubator la temperatura optimă pentru fiecare specie, iar după formarea coloniilor se calculează supraviețuirea, care se exprimă în procente.

Se pregătesc mai multe variante, de exemplu:

Doza de UV (ergi/mm²/s)	0	100	200	300	400	500
Timpul (s)	0	20	40	60	80	100
Diluția	10^{-6}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}

Viabilitatea (V) se calculează după formula:

$$V\% = \frac{\text{numărul de germeni/ml probă iradiată}}{\text{numărul de germeni/ml probă neiradiată}} \times 100$$

Curba de supraviețuire se calculează în mod asemănător și pentru alte tipuri de radiații (raze gamma, X, neutroni rapizi) sau substanțe chimice mutagene.

Tehnica de obținere a mutantelor de *Sacharomyces cerevisiae* rezistente la radiații UV (Snow, 1968). Se folosesc tulpini de *S. cerevisiae* de tip sălbatic sau mutante auxotrofe pentru diferite baze azotate sau aminoacizi.

— Celulele sînt însămînțate pe diferite medii de cultură (YEPG, mediu de sporulare și minimal, care conțin baze azotate și sînt lipsite de aminoacizi).

Mediul YEPG

Glucoză	20 g
Peptonă	20 g
Extract de drojdie	10 g
Agar-agar	20 g
Apă distilată	1 000 ml

Mediul de sporulare (KAS)

Extract de drojdii	2,5 g
Glucoză	1,0 g
Acetat de potasiu	10,0 g
Agar-agar	20,0 g
Apă distilată	1 000 ml

Mediul minimal

Glucoză	20 g
Baze azotate	6,7 g
Agar-agar	20 g
Apă distilată	1 000 ml

— Celulele, păstrate în frigider pe mediu YEPG înclinat, sînt inoculate în 4 ml mediu YEPG și incubate la 30°C pentru trei zile în condiții de agitare permanentă. Stadiul dezvoltării se apreciază după 4—5 zile de la însămînțare.

— Pentru obținerea mutantelor UVr, celulele haploide de tip sălbatic sînt cultivate în 10 ml mediu YEPG în vase Erlenmayer de 50 ml și incubate la 30°C, timp de 3 zile, în condiții de agitare permanentă.

— Cultura obținută se centrifughează, iar după îndepărtarea supernatantului se spală de două ori cu apă distilată. După cea de-a doua centrifugare se pregătește o suspensie în 10 ml soluție tampon fosfat de potasiu (pH 6,5), la care se adaugă 0,3 ml etil-metan sulfonat (EMS), se introduce în incubator pentru o oră și se agită în permanență. Viabilitatea celulelor tratate cu EMS este de circa 10%.

— Se centrifughează și, după ce se spală odată în apă distilată, se pregătește o soluție de tiosulfat de sodiu 6%, în care se menține 15 minute, după care se spală de 2—3 ori. După fiecare spălare se îndepărtează supernatantul.

— Se diluează de 10 ori în mediu YEPG lichid, se adaugă 1 ml-suspensie la fiecare din cele 10 eprubete care se folosesc și se introduc la incubator peste noapte, în condiții de agitare continuă.

— Diluții asemănătoare ale fiecărei eprubete se însămînțează pe mediu complet (sau YEPG) în vase Petri, în concentrație care asigură formarea a circa 200 colonii/vas.

— Coloniile formate (circa 3 zile) se transferă, prin metoda replicii, pe mediu minimal și mediu YEPG și se expun acțiunii radiațiilor UV (200 ergi/mm^2); peste noapte se introduc în incubator la 30 C.

Clonele presupuse sensibile sînt distruse, iar pe mediile minimal și YEPG se formează numai coloniile ce rezultă din celulele rezistente la radiații. Mutantele sensibile la radiații sînt selecționate din vasele folosite la replicare (vasele martor). Prin folosirea acestei tehnici, Snow a obținut 6 mutante UVr, fiecare în altă eprubetă, din aproximativ 10 000 colonii examinate. Nici una din tulpinile UVr nu s-au dovedit a fi mutante petite.

Acțiunea mutagenă a acidului nitros. Fiind foarte instabil în natură, acidul nitros se obține în laborator din sărurile sale stabile (nitratul de sodiu sau nitratul de potasiu) prin tratarea cu un acid.

Pentru a controla mutageneza chimică indusă de acidul nitros se iau în considerație trei factori: populația de celule, concentrația agentului mutagen, timpul de tratament.

Tehnica folosită pentru inducerea mutațiilor la bacterii se poate utiliza și la microorganismele eucariote (alge verzi, ciuperci etc.) *.

Inducerea mutațiilor la bacterii. Se folosește o populație bacteriană crescută pe mediu lichid (bulion) sau solid.

Medii de cultură pentru bacterii din genurile Brevibacterium și Corynebacterium (Săsărman, 1980):

Bulion nutritiv (% g/v)

Extract de carne Difco	0,3 g
Peptonă Difco	0,5 g
Clorură de sodiu p.a.	0,5 g
Apă distilată	1 000 ml

pH = 6,7

Se sterilizează 15 minute la 121°C

* Această tehnică este folosită în Laboratorul de genetică bacteriană al Institutului Victor Babeș, București.

Geloză nutritivă (% g/v)

Se prepară din bulion nutritiv la care se adaugă 2% agar-agar.

Mediul minimal pentru bacterii (% g/v)

Glucoză*	0,2 g
K_2HPO_4	0,7 g
KH_2PO_4	0,3 g
Citrat de sodiu . $3H_2O$	0,05 g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,01 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,1 g
Biotină	2,5 μg/l

Nitratul de sodiu se prepară sub formă de soluție 4M în ziua experienței și se autoclavează. Soluția de NaOH se prepară în concentrație de 1% dintr-o soluție-mamă de 10% în apă distilată și se sterilizează prin autoclavare, 15 minute, la 110°C. Acidul acetic se folosește în concentrație de 10% în apă distilată sterilă. Se folosește o soluție de fosfat disodic 1M care se autoclavează.

Se recomandă să se lucreze cu cel puțin două serii de cîte, cel puțin, 5 eprubete. În fiecare eprubetă (vas Erlenmayer) a primei serii se adaugă 0,1 ml NaOH 1% și 5 ml nitrat de sodiu. În prima eprubetă a seriei I se adaugă 0,10 ml acid acetic. Se așteaptă cîteva minute, pînă apar bule de gaz, semn al prezenței acidului nitros, se iau 2 ml din acest amestec și se introduc în prima eprubetă din seria II care conține 2 ml cultură bacteriană. După trecerea timpului stabilit, se adaugă 4 ml soluție tampon fosfat pentru neutralizarea acidului nitros și deci pentru oprirea mutagenezei. Concentrația acidului nitros poate fi crescută prin adăugare de acid acetic. Efectul mutagen este proporțional cu concentrația de acid nitros în stare născîndă și cu timpul de tratament.

Din amestecul neutralizat se însămînțează 0,1 ml în vase Petri pe geloză. A doua zi se înregistrează rezultatele. Pentru identificarea mutantelor auxotrofe, mediul minimal va fi suplimentat cu diverși factori de creștere (aminoacizi, vitamine, baze azotate).

Pentru izolarea mutantelor se folosește metoda replicii.

Inducerea mutațiilor la drojdii. Se folosește o cultură proaspătă, crescută pe mediu complet solid, dintr-o tulpină al cărei genotip este cunoscut.

Mediul complet pentru drojdii (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida* sp.)

Glucoză*	20 g	
Baze azotate	6,7 g	
Agar-agar	15 g	
Adenină	1 ml	(soluție 1%)
Uracil	1 ml	,,
Arginină	1 ml	,,
Histidină	1 ml	,,
Izoleucină	6 ml	,,

* Glucoza se sterilizează separat.

Leucină	6 ml	(soluție 1%)
Lizină	4 ml	,,
Metionină	1 ml	,,
Triptofan	1 ml	,,
Treonină	5 ml	,,
Tirozină	5 ml	,,
Fenilalanină	6 ml	,,

Se recoltează o porțiune dintr-o colonie și se însămînțează în două eprubete care conțin 5 ml mediu YEPG lichid, în condiții de agitare permanentă. Se apreciază că după 48 de ore (tulpinile diploide) sau 72 de ore (tulpinile haploide) culturile ating faza staționară.

Se fac observații la microscop și în situația în care mai mult de 95% din celule prezintă muguri, se apreciază că această cultură poate fi folosită pentru experiențe. În cazul în care frecvența celulelor înmugurite este peste 50%, se reintroduc la termostat și periodic se testează stadiul de dezvoltare a culturii, pînă la momentul în care cultura a atins faza staționară.

Din fiecare eprubetă se ia o mică probă pentru a se testa apariția eventualelor mutante de reversie. Acestea pot fi ușor selectate prin testarea capacității celulelor de a crește pe mediu lipsit de factorul de creștere controlat de gena respectivă. De exemplu, dacă se experimentează cu o tulpină auxotrofă cu genotipul le_{1-1} ad_{6-45} pot apărea spontan mutații de reversie pentru una sau ambele gene. În acest caz, celulele formează colonii pe mediul minimal sau pe mediu complet fără leucină și adenină, sau numai pe mediu complet fără un factor de creștere (leucină sau adenină) dacă reversia afectează o singură genă.

În perioada testării, culturile se păstrează la frigider (4°C). Înainte de continuarea experienței, se îndepărtează supernatantul, se adaugă apă distilată și se păstrează peste noapte, în condiții de agitare permanentă. Supraviețuirea se determină prin însămînțare pe mediu complet. A doua zi, celulele menținute peste noapte în apă distilată se spală de 2—3 ori tot în apă distilată. După fiecare spălare se centrifughează și se îndepărtează supernatantul.

Celulele spălate se suspendă în soluție tampon citrat de sodiu HCl 0,1 M (pH 4,5) și se pregătește o suspensie în concentrație de circa 2.10^8 celule/ml. Se stabilește concentrația acidului nitros care se obține prin dizolvarea $NaNO_2$ în același tampon. Se pregătește o suspensie de celule la care se adaugă $NaNO_2$ și se plasează cultura într-o baie reglată la 20°C și în condiții de agitare permanentă.

Acțiunea mutagenă este întreruptă cu ajutorul amestecului tiosulfat de sodiu — extract de drojdii.

Efectul mutagen al unor N-metilnitrozamide. Zimmerman, Schwaier și Laer (1965), studiind efectul mutagen al unor N-metilnitrozamide, au folosit o tulpină haploidă auxotrofă de *Saccharomyces cerevisiae* care necesită adenină (ad_{6-45}).

Tehnica de lucru:

— Se cultivă celule dintr-o cultură proaspătă de *S. cerevisiae* pe mediu YEPG lichid și se introduce la incubator, la 30°C. După 72 de ore

se controlează la microscop stadiul de dezvoltare a celulelor şi dacă toate celulele se află în acelaşi stadiu şi nu prezintă muguri (interfază) se apreciază că se poate efectua tratamentul.

— Celulele sînt suspendate în soluţie tampon citrat de sodiu 0,1 M (pH 2,5) şi fosfat de potasiu 1/15 M (pH 6,8). Tratamentul se efectuează la temperatura camerei (20—23°C) în condiţii de agitare permanentă. S-au folosit următoarele substanţe mutagene : NN'-dinitrozo-N, N'dimetiloxamidă (DDO), N-nitrozo-N-metilacetamidă (NMA); 1-metil-3-nitro-1-nitrozoguanidină (NMG); N-nitrozo-N-metiluree (NMH); N, N'-dinitrozo-NN'-dimetil-tereftalamidă (NMT); N-nitrozo-N-metiluretan (NMU); 1-nitrozo-imidazolidonă-2 (NIL).

— Concentraţia substanţelor mutagene a variat între 30 μ M (DDO) şi 100 mM (NMH). Timpul se stabileşte în funcţie de sensibilitatea celulelor, concentraţia substanţelor mutagene şi scopul urmărit.

— Reacţia este stopată prin diluare cu apă rece sau cu soluţie tampon.

— Se centrifughează 10 minute la 3 000 rpm şi se spală de două ori cu apă distilată. După fiecare spălare se centrifughează şi se îndepărtează supernatantul. Se pregăteşte o suspensie în apă distilată în concentraţie de $2 \cdot 10^2$/ml.

— Se însămînţează 0,1 ml în fiecare vas Petri şi se incubează la 30°C. Rezultatele se calculează după circa 3—4 zile.

Obţinerea mutantelor producătoare de L-lizină (Săsărman, 1980). S-au folosit tulpini care aparţin speciilor : *Brevibacterium lactofermentum*, *B. saccharolyticum*, *B. flavum*, *Corynebacterium glutamicum*, *C. melassecola*, care au fost tratate cu N-metil-N'-nitrozoguanidină (NG) sau iradiate cu ultraviolete, raze gamma şi neutroni rapizi.

Radiaţiile ultraviolete. Ca sursă de radiaţii s-a folosit o lampă UV de laborator la care s-a măsurat intensitatea de iradiere în ergi/cm²/s. Tulpina parentală în faza logaritmică de creştere, suspendată în tampon fosfat (pH=7), la o densitate de $12 \cdot 10^8$ celule/ml, a fost iradiată 61 secunde. Distanţa dintre lampă şi obiect a fost de 50 cm.

Radiaţii gamma şi neutroni rapizi. Ca sursă de radiaţii gamma s-a folosit 5 000 Ci Co^{60} care emite radiaţii gamma de 1,17 şi 1,34 Mev ; doza a fost de $7 \cdot 10^3$ R/h. Tulpinile parentale în faza logaritmică de creştere, în ser fiziologic, la o densitate de $1 \cdot 10^8$ celule/ml, au fost iradiate cu doze de 10, 20, 40, 60 şi 80 Kv.

Ca sursă de radiaţii mixtă (neutroni rapizi şi gamma) s-a folosit reactorul VVRS, iradierile efectuîndu-se în unele din canalele verticale unde fluxul are $3{,}6 \cdot 10^8$ n/cm².

N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidină (NG). Celulele au fost suspendate în soluţie tampon tris-maleat (pH=6), în densitate de $1{,}2 \cdot 10^8$ celule/ml. Celulele au fost tratate cu NG în concentraţie de 50 μg/ml, timp de 1, 2 sau 3 ore. După tratament, celulele au fost spălate cu soluţie izotonică de clorură de sodiu.

Mutantele induse de diferiţi factori mutageni fizici şi chimici au fost izolate cu ajutorul tehnicii replicii, prin transferarea coloniilor pe mediul minimal.

6.2. Metode de identificare a mutaţiilor la microorganisme

Frecvenţa mutaţiilor la microorganisme variază în limite foarte mari, în funcţie de specie, caracterul afectat, gradul de ploidie şi o serie de factori ai mediului sau experimentali : pH-ul soluţiei (mediului), temperatura etc.

Pentru identificarea mutaţiilor naturale sau induse s-au elaborat mai multe metode, cea mai simplă fiind depistarea mutantelor ce afectează genele care controlează culoarea sau morfologia coloniilor. De exemplu, la *Saccharomyces cerevisiae*, gena ad_6^+ (adenină) determină culoarea roşie a coloniei sau gena rgh^+ (rough) controlează fenotipul rugos. Asemenea gene se întîlnesc şi la alte specii de ciuperci sau bacterii, fiind posibilă identificarea şi izolarea directă a mutantelor.

6.2.1 Metoda dispersiei

Metoda, elaborată de Newcombe (1942), permite identificarea şi izolarea mutantelor rezistente la antibiotice, radiaţii, bacteriofagi etc. Bacteriile de tip sălbatic, sensibile la streptomicină, de exemplu, se cultivă pe mediu nutritiv lichid după care se transferă pe plăci cu geloză nutritivă şi sînt incubate la 37°C, cîteva ore (pînă la formarea coloniilor). Din o parte din colonii se pregătesc suspensii în mediu nutritiv lichid şi se dispersează pe alte plăci cu geloză ce conţin streptomicină. În felul acesta, bacteriile ce provin dintr-o colonie se separă una de alta. Pe aceste plăci se vor forma mai multe colonii rezistente la streptomicină decît pe cele care au rămas neschimbate.

6.2.2. Metoda replicii

Demonstrarea caracterului spontan al mutaţiei la bacterii este dificilă din cauza frecvenţei foarte scăzute cu care apar mutaţiile spontane în raport cu populaţia bacteriană de tip sălbatic. De exemplu, mutantele rezistente la penicilină (P^r) aflate într-o populaţie predominant sensibilă (P^s), pot fi identificate numai în prezenţa penicilinei. În absenţa agentului selectiv, modificările individuale rămîn nemanifestate.

Metoda replicii elaborată de Lederberg şi Lederberg (1952) dă posibilitatea izolării mutantelor în absenţa factorilor selectivi din mediul de cultură. Pe o placă cu mediu nutritiv solid se însămînţează celule de *E. coli* sensibile la un antibiotic sau la un bacteriofag. Culturile se incubează la 37°C, iar după formarea coloniilor se transferă pe alte plăci.

Procedeul este următorul : pe un suport cilindric, cu diametrul puţin mai mic decît vasul Petri, se plasează bucăţi de catifea sterilă, care se fixează cu un inel metalic pentru a-şi menţine poziţia în timpul lucrului. Se plasează placa pe care se găsesc coloniile bacteriene, cu faţa în jos peste dispozitiv şi se presează uşor, astfel încît coloniile să se imprime pe catifea. Această cultură serveşte drept matriţă pentru inocularea pe celelalte plăci, fiecare fir de catifea fiind o ansă sterilă de însămînţare

cînd plăcile cu agar sînt întoarse pe catifea. Prin plasarea replicatorului cu catifea pe alte plăci cu mediu nutritiv solid, printr-o uşoară presare se transferă coloniile în alte vase (fig. 15). Coloniile de pe aceste plăci se

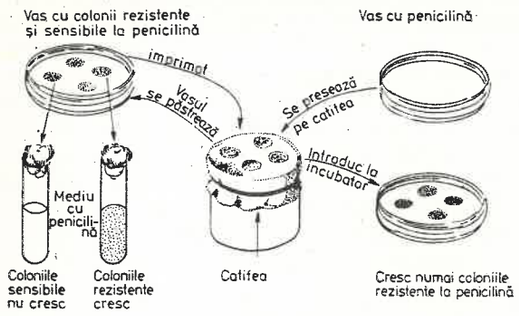


Fig. 15. — Reprezentarea schematică a metodei replicii.

formează în locurile corespunzătoare plăcii iniţiale, celulele fiecărei colonii care s-au dezvoltat pe placa iniţială fiind aranjate pe noile plăci fără a fi perturbate relaţiile lor spaţiale. Prin această tehnică se demonstrează că apariţia clonală a mutaţiilor bacteriene are loc spontan şi independent de condiţiile de mediu. Plăcile se introduc la incubator pentru creşterea şi multiplicarea celulelor şi formarea coloniilor.

Prin folosirea metodei replicii se poate obţine un număr mare de plăci, cu acelaşi număr de colonii şi aceeaşi dispoziţie topografică iniţială. De exemplu, prin tratarea celulelor de tip sălbatic (prototrofe) de bacterii, alge sau ciuperci cu factori fizici (radiaţii ultraviolete, gamma, X) sau substanţe chimice mutagene pot rezulta mutante auxotrofe care pot fi identificate pe mediu minimal sau complet din care lipsesc unul sau mai mulţi factori de creştere. După incubare se observă că mutantele auxotrofe pentru adenină, de exemplu, nu vor forma colonii pe mediul minimal sau pe mediul complet din care lipseşte adenina.

Izolarea culturii pure de mutantele rezistente la antibiotice sau bacteriofagi, fără folosirea agenţilor selectivi sau de inducere, se realizează, de asemenea, prin metoda replicii, procedînd astfel: coloniile cu celule predominant sensibile crescute atît pe mediu nutritiv, cît şi pe mediu ce conţine fagi se imprimă pe catifea. Aria de creştere a celulelor rezistente pe plăcile cu mediu nutritiv plus fag are corespondent pe plăcile numai cu mediu nutritiv. Se iau coloniile rezistente de pe agarul nutritiv din locurile corespunzătoare plăcilor cu mediu plus fag şi se transferă în bulion nutritiv, urmărindu-se cultura, respectiv mărirea numărului de mutante. Se introduc în incubator la 37°C, 16 ore, după care se însămînţează pe agar nutritiv, obţinîndu-se astfel o concentraţie mare de celule rezistente la fag. Folosind acest procedeu de selecţie indirectă este posibil să se obţină o cultură pură constînd din celule rezistente la fag; aceste populaţii rezistente selectate indirect nu au fost expuse fagului sau antibioticului. Prin aceasta se confirmă originea mutaţională a acestor celule, independent de condiţiile de mediu.

6.2.3. Metoda fluctuaţiei

Metoda, elaborată de Luria şi Delbrück (1943), se foloseşte pentru izolarea mutantelor la bacterii rezistente la bacteriofagi, radiaţii şi diferite substanţe chimice mutagene. Dacă, de exemplu, se infectează o cultură de *E. coli* cu bacteriofagul T1 în exces, marea majoritate a bacteriilor sînt lizate şi numai o mică parte rezistă şi formează colonii. Pentru a stabili dacă aceste mutante preexistau în cultură, iar infecţia fagică permite numai selecţia lor, Luria şi Delbrück au elaborat metoda fluctuaţiei. Pentru acesta se pregăteşte o cultură de *E. coli* pe mediu lichid, cu o densitate de aproximativ 1 000 celule/ml. Această suspensie de bacterii sensibile la bacteriofagi se împarte în două, o parte se transferă într-un balon, iar a doua în 15 tuburi (eprubete) în care se pun cîte 0,5 ml, după care se introduc la incubator la 37°C, pentru 24—36 de ore (fig. 16). Suspensia

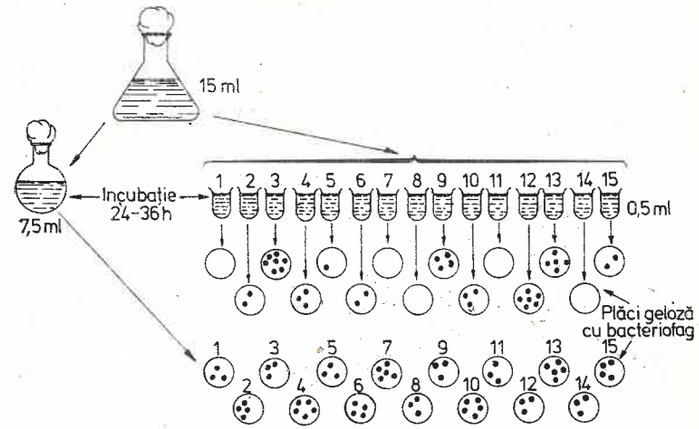


Fig. 16. — Reprezentarea schematică a metodei fluctuaţiei.

din balon se agită şi se însămînţează pe 15 plăci de geloză nutritivă, în care se găseşte încorporat bacteriofagul T1. La fel se procedează şi cu suspensia din cele 15 tuburi, conţinutul fiecăruia (0,5 ml) însămînţîndu-se pe o placă cu geloză nutritivă infectată cu bacteriofagul T1. Se introduc în incubator la 37°C.

După o anumită perioadă de timp, marea majoritate a bacteriilor pier, supravieţuind numai mutantele spontane care rezistă la bacteriofag şi formează colonii. S-a observat că pe plăcile cu geloză pe care s-a însămînţat suspensia din balon s-a format un număr de colonii relativ uniform (3—5) rezistente la bacteriofag. Această uniformitate se datoreşte faptului că bacteriile mutante au avut posibilitatea să se înmulţească în balon, iar prin agitare au fost repartizate uniform în suspensie. În contrast cu această situaţie, pe plăcile cu geloză pe care s-au însămînţat suspensiile din cele 15 tuburi s-a format un număr diferit de colonii (1—7), iar pe unele nu s-a format nici o colonie. Dacă mutaţia s-a produs cu puţin timp

înainte de însămînţarea pe placa de geloză, va apărea o singură colonie, iar dacă suspensia a fost menţinută în incubator un timp suficient pentru a se înmulţi, pe plăcile cu geloză se formează mai multe colonii mutante, rezistente la bacteriofagul T1.

Metoda fluctuaţiei poate fi folosită pentru izolarea şi calcularea frecvenţei atît a mutaţiilor spontane, care se pot izola selectiv prin infecţia cu un virus, cît şi a celor induse de diferiţi agenţi mutageni chimici şi fizici. Cunoscînd numărul iniţial de bacterii însămînţate şi cel final, precum şi numărul de mutaţii se poate calcula frecvenţa mutaţiilor (fig. 17).

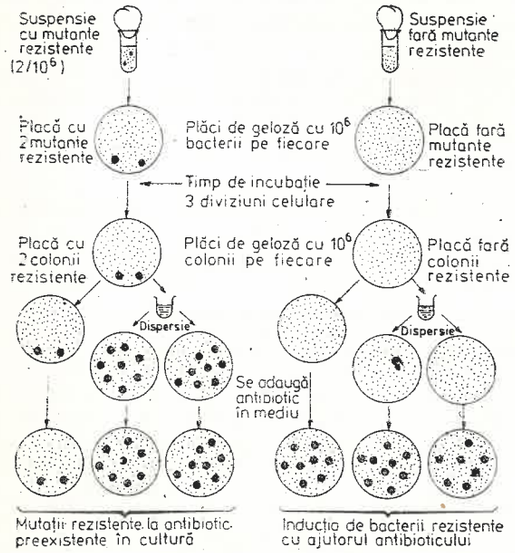


Fig. 17. — Izolarea de mutante prin metoda fluctuaţiei.

Metoda fluctuaţiei poate fi folosită şi la alte microorganisme (alge, ciuperci etc.).

6.2.4. Metode de izolare a mutantelor biochimice

Mutantele auxotrofe întîlnite frecvent la microorganisme se caracterizează prin incapacitatea de a sintetiza metaboliţii necesari creşterii şi reproducerii, de aceea nu cresc pe medii din care lipsesc aceşti metaboliţi (aminoacizi, vitamine, baze azotate).

Metoda de izolare a mutantelor auxotrofe (Davis, 1950) se bazează pe capacitatea penicilinei de a distruge bacteriile care desfăşoară o activitate vitală. Prin adăugare de penicilină în mediul minimal, care conţine numai săruri anorganice şi glucoză, marea majoritate a bacteriilor însămînţate sînt distruse, supravieţuind numai bacteriile care sînt incapabile să crească pe acest mediu. Această fracţiune este reprezentată de mutante auxotrofe care se pot separa din mediul prin centrifugare. După eliminarea

supernatantului se spală celulele pentru îndepărtarea penicilinei şi se însămînţează pe mediu complet. După formarea coloniilor, acestea se transferă, prin metoda replicii, pe mediu complet din care lipsesc diferite substanţe. Se pot transfera şi pe mediu minimal la care se adaugă una sau mai multe substanţe chimice. La *E.coli* K_{12}, procentul mutantelor auxotrofe este foarte scăzut (aproximativ 1.10^4).

Metoda Beadle — Tatum. Beadle şi Tatum (1945) au imaginat o metodă pentru identificarea şi izolarea mutantelor biochimice la *Neurospora crassa*, dar care poate fi folosită şi în cazul altor specii de microorganisme.

Conidiile, care sînt folosite pentru fecundarea ascogonului de la tipul sexual opus, sînt iradiate sau tratate cu substanţe chimice mutagene. Ascosporii, ce rezultă în urma diviziunii celulare, sînt însămînţaţi pe mediu complet.

După formarea miceliului se ia o porţiune din acesta şi se transferă pe mediu minimal. Dacă miceliul continuă să crească înseamnă că nu s-au produs mutaţii (fig. 18), iar dacă îşi încetează creşterea, se presupune că

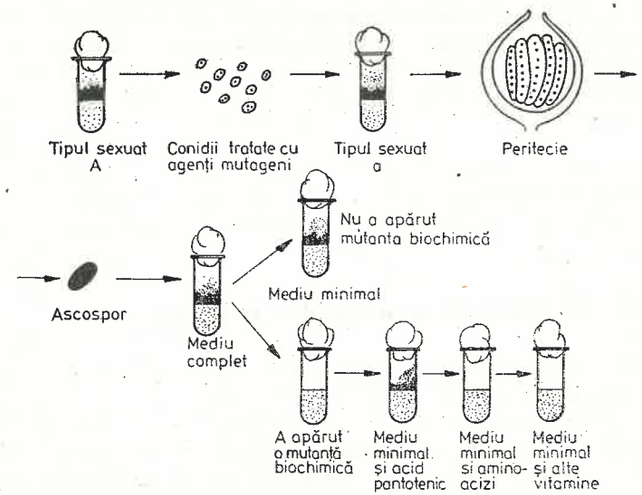


Fig. 18. — Identificarea unor mutante auxotrofe la *Neurospora crassa*.

s-a produs o mutantă biochimică. Pentru a stabili care genă a fost afectată se recoltează miceliul crescut pe mediul complet şi se introduce în mai multe eprubete care conţin mediu minimal la care s-au adăugat diferiţi factori de creştere. Dacă, de exemplu, miceliul nu creşte pe mediu minimal, dar creşte pe mediu minimal plus adenină sau lizină, înseamnă că prin tratarea cu substanţe mutagene sau iradiere a rezultat o mutantă auxotrofă, prin blocarea lanţului metabolic ce duce la sinteza adeninei, respectiv a lizinei. Pot apărea şi mutante duble, triple etc. care pot fi identificate prin aceeaşi tehnică.

Metoda chemostatului. Novick şi Szilard (1950) au imaginat un aparat, denumit chemostat, prevăzut cu două tuburi (fig. 19), prin unul se introduce mediul de cultură, iar prin celălalt se evacuează excesul de

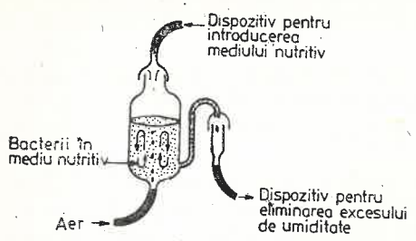


Fig. 19. — Chemostatul Novick-Szilard

umiditate, asigurîndu-se reglarea cantităţii de mediu nutritiv şi implicit dirijarea procesului de înmulţire a celulelor. Dacă se întrerup introducerea mediului de cultură şi evacuarea excesului de umiditate au loc scăderea concentraţiei mediului, prin folosirea sa de către bacterii, şi creşterea concentraţiei produşilor de excreţie. Procesul de înmulţire a bacteriilor poate fi dirijat prin reglarea cantităţii de mediu, introducerea unei cantităţi mai mari de mediu determinînd o înmulţire mai rapidă a bacteriilor şi invers.

În cazul apariţiei unei mutaţii, care se înmulţeşte cu aceeaşi viteză ca bacteriile iniţiale, aceasta nu poate fi observată imediat, ci numai după mai multe generaţii, pe măsură ce numărul descendenţilor mutaţiei creşte progresiv cu numărul de bacterii. Prin introducerea în chemostat a unei cantităţi mari de mediu nutritiv se reduce timpul necesar apariţiei unei noi generaţii, avînd loc o creştere proporţională a numărului de mutaţii, odată cu scurtarea timpului necesar reproducerii bacteriilor.

6.3. Metode de inducere a mutaţiilor la plante

Pentru inducerea de mutaţii la plante se folosesc metode variate de tratament, în funcţie de agentul mutagen, de specie, de soi, şi de momentul în care se aplică tratamentul. Pentru obţinerea unui material valoros din punct de vedere economic se recomandă respectarea următoarelor condiţii :

— să se trateze cele mai productive soiuri aflate în cultură, dar care prezintă deficienţe, cum sînt rezistenţa la cădere, ger, secetă, boli şi dăunători etc. ;

— să se trateze un număr mare de plante sau seminţe, iar selecţia mutantelor rezultate să se facă în F_1, pentru mutantele dominante, şi în F_2, F_3, pentru identificarea şi izolarea mutantelor recesive ce apar în urma segregării ;

— să se folosească doze (sau concentraţii) puternice de mutageni pentru obţinerea unui procent ridicat de mutaţii.

Plantele tratate sau cele ce rezultă din seminţe tratate sînt notate cu X_1, N_1, în cazul utilizării razelor X sau neutronilor, cu X_2, X_3 ... X_n, N_2, N_3 ... N_n în cazul generaţiilor a doua, a treia etc. sau chiar cu F_1, F_2 ... F_n.

Experienţele de inducere a mutaţiilor la plante au fost orientate în cîteva direcţii principale :

— obţinerea unor forme noi de plante care să fie utilizate direct în producţie sau ca material iniţial pentru ameliorarea soiurilor existente în cultură ;

— obţinerea unor mutante care manifestă rezistenţă la boli şi dăunători ;

— inducerea sterilităţii la plante ;

— utilizarea radiaţiilor pentru a realiza transferul unui segment cromozomial şi implicit de gene de la o specie la alta.

Cereale. Se tratează seminţe negerminate, uscate sau umede, seminţe germinate sau plantule tinere.

Hordeum vulgare (orzul). Primele experienţe de inducere a mutaţiilor la orz cu ajutorul razelor X au fost iniţiate în 1928 de Stadler. Ulterior au fost realizate cercetări de Gustafsson (1941), Scholz (1957), Heslot (1960), Karapetian (1961), Priadcencu (1965).

Prin tratarea seminţelor cu substanţe mutagene se obţin numeroase mutante clorofiliene, care au următoarele denumiri : — *albina*, lipsă de clorofilă şi caroten ; — *xantha* lipsă de clorofilă sau exces de caroten ; — *virescens*, culoarea uniformă verde deschis ; — *chlorina*, culoarea verde-gălbuie ; — *viridoalbina*, vîrful frunzelor verde, baza albă ; — *alboviridis*, vîrful frunzelor alb, baza verde ; — *alboxantha*, vîrful frunzelor alb, baza galbenă ; — *xanthalba*, vîrful frunzelor galben, baza albă ; — *tigrina*, benzi transversale brune sau galbene ; — *striata*, benzi longitudinale albe sau galbene ; — *maculata*, lipsa pigmenţilor pe porţiuni sau puncte.

Ferrary (1959) a obţinut linii valoroase la orz prin utilizarea razelor X, gamma şi a neutronilor termici. Cele mai bune rezultate au fost obţinute prin tratarea seminţelor negerminate din soiul Rika cu doze de 20 000—25 000 r şi din soiul Pirolina cu doze de 15 000 r. Pentru raze gamma s-a folosit o sursă de ^{60}Co, iar pentru neutronii termici o pilă atomică cu un flux de 30×10^{12} N^{th} /cm^2.

Grünvald (1969) a obţinut rezultate interesante prin tratarea seminţelor de orz din soiul Cenad 396 cu neutroni termici. Aceştia au provocat o variabilitate foarte pronunţată, dînd posibilitatea selecţionării unor mutante precoce, rezistente la tăciunele zburător, productive şi cu un conţinut ridicat de proteine în bob.

Triticum aestivum (grîul comun). Priadcencu şi colab. (1960) au tratat seminţe uscate din soiul A 15 cu raze X în doze de 20 000 şi 25 000 r şi cu neutroni termici în doze de $9{,}07 \times 10^{12}$ N^{th} /cm^2, timp de 2 ore. La plantele ce s-au dezvoltat din seminţe tratate au apărut modificări privind habitusul, perioada de vegetaţie, rezistenţa la boli şi cădere, fertilitatea şi productivitatea. Prin selecţie individuală au fost obţinute linii ce au dat o producţie superioară soiului iniţial. Astfel, din seminţele tratate cu o doză de $1{,}13 \times 10^{13} N^{th}$/cm^2 s-au izolat în F_3 49 de linii, din care 67,4% au fost mai productive, iar 14,3% au depăşit în producţie soiul martor cu peste 20%.

Mac Key (1954) a tratat seminţe negerminate de grîu de toamnă, de primăvară şi de orz cu raze X în doze de 10 000—20 000 r, obţinînd numeroase mutante importante caracterizate prin rezistenţă la cădere şi

rugini, mai productive şi cu boabe de calitate superioară soiului martor. Printre altele, a obţinut 1 949 de mutante, din care 35,0% cu spic lax, 19,7% cu spic dens, 28,3% de tip speltoid, 14,1% cu pai scurt, 27,8% de tip aristat, 24,5% tip de toamnă şi 0,2% forme cu defecte clorofiliene.

Scarascia Mugnozza (1965) a obţinut rezultate valoroase prin tratarea seminţelor de *T. durum* cu diferiţi agenţi fizici (raze X, neutroni termici) şi chimici (EMS şi DES). A obţinut mutante care se evidenţiau prin rezistenţă la cădere, talie redusă a plantelor, capacitate ridicată de valorificare a îngrăşămintelor azotate, producţie superioară de boabe. Astfel, mutantele Cp C 132 şi Cp C 48 au depăşit în producţie soiul Cappeli cu 15—20%.

Zea mays (porumbul). La această specie s-au obţinut numeroase mutante clorofiliene sau care afectau diferite caractere morfologice. Diaconu şi Banu (1969) au iradiat seminţe uscate din soiul Românesc de Studina şi ICAR-54 cu neutroni termici în doză de $1{,}08 \times 10^{13} N^{th}/cm^2/s$ (Laboratorul naţional Brookhaven S.U.A. şi IFA Bucureşti) cu o intensitate de 8×10^8, 20 minute, cu un flux integral de $1 \times 10^{12} N^{th}/cm/s$. Ei au obţinut numeroase mutante care afectau cele mai variate caractere morfologice, fiziologice şi biochimice ale plantelor.

Avena sativa (ovăz). Mac Key (1954) a tratat seminţe negerminate cu raze X în doze de 10 000—20 000 r, iar Frey (1956) a tratat seminţe uscate cu raze X în doze de 25 000 r, selecţionînd numeroase mutante, unele cu valoare economică. Dintre modificările induse amintim: paiul mai scurt, rezistenţă mai mare la cădere şi la rugini, precocitate şi productivitate superioară soiului iniţial Huron.

Oryza sativa (orez). S-au iradiat seminţe negerminate cu raze gamma, în doze de 15 000 r, emise de o sursă de ^{60}Co, şi s-au obţinut mutante care manifestau rezistenţă la cădere.

Leguminoase şi plante industriale. *Pisum sativum* (mazăre). Gehin (1954) a iradiat seminţe îmbibate în prealabil în apă, 24 de ore, cu raze X, în doze de 15 000 r. În F_2 s-a selecţionat o mutantă (linia 700) caracterizată prin formarea unui număr mare de ramificaţii şi boabe, depăşind cu 5,8% producţia de boabe a soiului iniţial Kloster.

Prin iradierea seminţelor de mazăre furajeră din soiul Parvus, în F_4 a apărut o mutantă de tip „gigas" care a depăşit cu 30% în dimensiuni soiul iniţial. Mutanta „gigas" s-a dovedit superioară şi în privinţa dimensiunilor păstăilor şi a greutăţii boabelor.

Glycine soja (soia). Zaharias (1956) a iradiat seminţe negerminate cu raze X în doze de 6 000, 8 000, 10 000 şi 12 000 r. Pentru iradiere s-a folosit un aparat Röntgen cu următoarele caracteristici: 180 KV, 15 mA, un filtru de cupru de 0,5 mm cu o intensitate de iradiere de 102,4 r/minut la distanţa de 40 cm. El a obţinut numeroase mutante ce prezentau o mare variabilitate în ceea ce priveşte perioada de vegetaţie, numărul de ramificaţii, mărimea tufei, forma şi mărimea frunzelor şi păstăilor, mărimea şi culoarea boabelor, reprezentînd un valoros material pentru selecţie.

Giosan şi Nicolae (1970) au tratat seminţe uscate de *Glycine hispida* subsp. *manshurica* var. *latifolia* cu neutroni termici în diferite doze ($1{,}05 \times 10^{13} N^{th}/cm^2/s$ şi $1{,}41 \times 10^{13} N^{th}/cm^2/s$) şi raze gamma în doze de 25 Kr şi 30 Kr. În afara iradierilor simple s-a efectuat şi reiradierea unor linii de soia provenite din generaţia M_1. Seminţele iradiate au fost semănate

direct în cîmp. Din acest material au rezultat numeroase mutante ce se caracterizează prin precocitate, productivitate mai mare, rezistenţă la unii factori nefavorabili de mediu.

Phaseolus vulgaris (fasolea). Down şi Andersen (1956) au iradiat boabe uscate cu raze X în diferite doze, obţinînd o serie de mutante valoroase, utilizate pentru ameliorarea soiurilor iniţiale. Pentru aceasta au încrucişat între ele cele mai valoroase mutante din soiul Sanilak, care se caracterizează prin producţie şi precocitate superioare soiului ce se cultivă în statul Michigan. De asemenea, mutantele respective sînt rezistente la rasa α de *Colletotrichum lindemuthianum* şi sînt foarte puţin atacate de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Vicia faba (bobul) a fost utilizată de numeroşi cercetători datorită unor avantaje pe care le prezintă, cum sînt: numărul mic de cromozomi ($2n = 12$) şi de dimensiuni mari.

Raicu şi Stoian (1969) au studiat efectul unor derivaţi purinici asupra cromozomilor şi ciclului mitotic, cum sînt: adenina, adenozina, acidul 3′-adenilic, xantina, hipoxantina, în concentraţii variate. Seminţele de bob au fost puse la germinat în condiţii de oxigenare bogată şi temperatură constantă (25°C). Tratamentul s-a făcut la rădăcini de 2—2,5 mm lungime, timp de 4 ore. Din rădăcini s-au pregătit preparate squash, după metoda rapidă Feulgen, şi studiindu-se la microscop s-au pus în evidenţă numeroase aberaţii cromozomiale. Pentru a studia procesul de refacere, după tratament radicelele au fost transferate în apă 24—48 de ore.

Lupinus luteus (lupinul). Tedin şi Hageberg (1952) au tratat seminţe cu raze X în doze de 15 000 r. Din acestea au izolat numeroase mutante, caracterizate printr-o perioadă de vegetaţie mai scurtă şi un habitus puternic modificat.

Arachis hypogaea (alunele de pămînt). S-au iradiat boabe umectate cu raze X în doze între 9 000 şi 18 000, urmărindu-se reducerea capacităţii de germinaţie în momentul recoltării şi reducerea pagubelor ce apar din cauza ploilor abundente în această perioadă.

Lycopersicon aesculentum (tomate). Stubbe (1958) a obţinut cu ajutorul razelor X peste 350 de mutaţii la *L. aesculentum* şi peste 250 de mutaţii la *L. pimpinellifolium*.

Verkerk (1959) a iradiat seminţe de tomate din soiul Ailsa Craig cu neutroni produşi de o pilă atomică cu o putere de 0,5 Kw. Doza folosită a fost de $5{,}1 \times 10^8 N^{th}/cm^2/s$, timp de 4 şi 8 ore. Tratamentul a influenţat nefavorabil facultatea germinativă şi a întîrziat germinaţia seminţelor. Astfel, din 450 de seminţe tratate timp de 4 ore au supravieţuit 160 de plante, din care 110 au fost sterile, iar 50 au ajuns la maturitate şi au format seminţe.

Lactuca sativa (salata). Dommergues (1960) a studiat efectul mutagen al unor radiaţii ionizante şi substanţe chimice, folosind soiul „Merveille des 4 saisons". Seminţele negerminate au fost tratate cu raze gamma, emise de o sursă de ^{60}Co, sau prin imersionare 24 de ore, la 23°C, într-o soluţie de substanţe chimice mutagene. Tratamentul a determinat apariţia unor himere şi plante cu fasciaţii.

Linum usitatissimum (inul de fibre şi de ulei). Hoffman şi Zoschke (1955) au iradiat cu raze X seminţe din patru soiuri cultivate pentru fibre sau ulei. Iradierea s-a făcut cu un aparat Röntgen cu următoarele carac-

teristici : 150 KV 4 mA, filtru de aluminiu de 2 mm şi capacitatea de 34,5 r/minut, în doze de 10 000, 20 000, 30 000, 40 000, 50 000 şi 60 000 r. Seminţele uscate sau înmuiate înaintea tratamentului timp de 24 de ore au fost iradiate într-o soluţie de 0,5% de metale grele Ba $(NO_3)_2$, $Pb(NO_3)_2$ şi $U(NO_3)_4$. Mutantele obţinute se deosebeau de soiurile iniţiale prin culoarea şi formă florilor, culoarea staminelor, culoarea şi greutatea seminţelor, conţinutul în ulei în seminţe, lungimea fibrei, lungimea perioadei de vegetaţie etc.

Solanum tuberosum (cartoful). Hagberg (1952) a iradiat tuberculi cu raze X şi ^{32}P folosind următoarea tehnică : tuberculii au fost secţionaţi longitudinal în două părţi egale, o jumătate a fost iradiată cu 5 000—10 000 r, iar cealaltă a servit ca martor.

Pentru tratarea cu ^{32}P s-a utilizat următoarea tehnică : cu ajutorul unui burghiu s-a făcut în fiecare tubercul un orificiu, în care s-au introdus 5 cm^3 de soluţie conţinînd 31—500 microcurie de ^{32}P ; tuberculii martor s-au introdus în apă de robinet. Orificiile au fost acoperite cu o bucată de tubercul scoasă cu burghiul. Tuberculii au fost lăsaţi astfel mai multe zile, după care au fost puşi la germinat şi plantaţi pe teren.

Plante ornamentale. S-au iradiat cu raze X ramuri de trandafir la începutul vegetaţiei, cu doze de 600—800 r, bulbi de gladiole la începutul vegetaţiei, cu doze între 4 000 şi 8 000 r, şi butaşi înrădăcinaţi cu cinci frunze de *Chrysanthemum indicum* (crizantemă) cu doze de 3 000 r, urmărindu-se obţinerea unor mutante cu flori de forme şi culori diferite, cu înflorire abundentă, precoce etc.

La plantele ornamentale ce se înmulţesc vegetativ s-au obţinut prin iradiere mutaţii somatice. Astfel, la Brookhaven National Laboratory, prin iradierea cu radiaţii gamma a varietăţii de garoafă „William Sim", cu flori roşii (*Dianthus caryophyllus*) s-au obţinut mutante somatice cu flori albe şi roz deschis. Prin iradierea varietăţii cu flori albe, White Sim, au apărut plante cu flori roşii sau plante care prezentau concomitent ramuri cu flori albe şi ramuri cu flori roşii. Cercetările citologice au demonstrat că acest soi este alcătuit din ţesuturi diferenţiate genotipic, culoarea albă a florilor fiind determinată de un singur strat de celule din epidermă, iar cea roşie de ţesuturile interioare.

Antirrhinum majus (gura leului). Duma (1972) a studiat efectul mutagen al colchicinei, razelor X şi dietilsulfatului asupra seminţelor şi plantelor acestei specii. S-au tratat plantele în momentul formării primei perechi de frunze adevărate, prin pipetarea unei soluţii de colchicină 0,2 şi 0,5%. În urma tratamentului au apărut modificări ale habitusului şi culorii florilor, care se menţin şi în generaţiile următoare. Colchicina a determinat modificarea tufei (înălţimea şi ramificaţia), aspectul frunzelor, mărimea şi culoarea florilor.

Dietilsulfatul (DS) în soluţii apoase de 0,5 şi 1‰ a determinat modificări morfofiziologice cum sînt : reducerea capacităţii de germinare şi o întîrziere a germinării în relaţie lineară cu doza şi timpul de tratament. La varianta tratată cu DS 0,5‰, capacitatea de germinare a fost de 66,66% pentru materialul tratat 1 şi 2 ore ; după un tratament de 4 ore capacitatea de germinare scade la 57,47% ; cea mai mică capacitate germinativă, de 36,78%, s-a observat la varianta tratată 6 ore. În cazul variantelor tratate cu concentraţii de 1‰ capacitatea germinativă scade

mai mult, la 6 ore fiind de 8,04%. Dintre modificările morfologice amintim : apariţia unor plantule cu frunzele lipite, frunze în formă de cornet, lingură, gofrate, plante cu ramificaţie modificată, plante pitice şi cu aspect deformat. De asemenea s-a observat apariţia în F_1 a unor plante poliploide, cu tufa bogat ramificată şi frunze caracteristice plantelor $4n$. S-au observat modificări în privinţa coloritului frunzelor, fiind influenţată şi intensitatea culorii.

Din materialul iradiat s-au selecţionat două linii diferite în privinţa aspectului frunzelor şi portului general al plantei şi culorii florilor.

Pomi fructiferi. În scopul inducerii mutaţiilor la pomii fructiferi au fost elaborate tehnici speciale. Tratamentul cu radiaţii ionizante se aplică la ramuri cu cîţiva ochi, în timpul perioadei de repaus, după care materialul se altoieşte pe portaltoi obişnuiţi. Tratamentul cu ^{32}P şi ^{35}S se efectuează prin injectarea de soluţii în tulpini, ramuri sau muguri, primăvara înaintea începerii vegetaţiei.

Gröber (1959) a iradiat cu raze X, în doze cuprinse între 1 000 şi 7 500 r, circa 3 000 de ramuri de măr cu 4—5 ochiuri şi circa 2 000 de ochiuri separate din soiurile : Weisser Klarapfel, James Grieve, Ontario şi Gravensteiner. La ramuri au fost iradiaţi numai 2 muguri la vîrf, iar restul au fost protejaţi acoperindu-se cu plăci de plumb de 66 mm grosime. Ramurile tratate au fost altoite în coroana unor meri de 7—8 ani. S-au obţinut numeroase mutante cu modificări privind perioada coacerii fructelor, forma, mărimea şi culoarea fructelor etc. Un interes deosebit îl prezintă mutantele care formează fructe de culoare roşie la soiul Weisser Klarapfel, care în mod normal formează fructe albe-gălbui.

Vitis vinifera (viţa de vie). S-au tratat butaşi cu raze gamma, emise de ^{60}Co, în doze de 2 000—3 000 r, primăvara cînd se apropie începerea vegetaţiei. După tratament, butaşii au fost plantaţi în seră timp de un an şi apoi transplantaţi în cîmp. Plantele tratate au prezentat numeroase modificări anatomomorfologice.

Plante forestiere. Speciile din familia *Pinaceae* au fost obiectul numeroaselor cercetări de studiere a efectului radiaţiilor.

Beñea şi colab. (1965) au iradiat seminţe de molid (*Picea abies*), pin comun (*Pinus silvestris*) şi duglas brumăriu (*Pseudotsuga manziesii*), folosind o soluţie radioactivă de fosfat disodic (Na_2HPO_4) marcat cu ^{32}P. Energia radiofosforului a fost de 1,69 MeV. Seminţele au fost tratate timp de 12, 24, 36 şi 48 de ore. După tratament seminţele au fost spălate sub jet continuu de apă curată, 30 minute, după care au fost puse la germinat în vase Petri, pe hîrtie de filtru şi nisip umed, la 18—22°C. S-au obţinut puieţi cu caracteristici superioare martorului. Se evidenţiază în mod deosebit creşterea în înălţime, ce depăşeşte cu 37—90% plantele martor.

Radiaţiile şi poliploidia. Zolyneak (1969) a iradiat cu raze X, în doze diferite (5 000, 10 000, 20 000, 25 000, 30 000, 35 000, 40 000, 45 000 şi 50 000 r), seminţe uscate (procentul de umiditate între 7 şi 9), seminţe saturate în apă (ţinute în apă 24 de ore) şi seminţe încolţite (iradiate după 3 zile de la punerea la încolţit), diploide şi tetraploide, provenite de la *Lycopersicon aesculentum*, soiul Yellow Pear Shaped. Iradierea s-a făcut cu ajutorul unui defectoscop (20 mA, 245 V tensiune primară, 200 KV tensiune secundară), obiectul de studiu fiind aşezat la o distanţă de 22 cm

de sursă, ceea ce înseamnă 1 Kr/s. Temperatura mediului în care s-a realizat iradierea a variat între 19 și 22°C.

Pe baza experiențelor efectuate s-au desprins următoarele: formele tetraploide manifestă o rezistență sporită la iradieri față de cele diploide; sensibilitatea la iradieri cu raze X scade atît pentru forma diploidă, cît și pentru cea autotetraploidă, la o anumită valoare a dozei, în funcție de conținutul în apă și de intensitatea proceselor fiziologice la nivelul materialului genetic.

Radu și Raicu (1969) au studiat relația radiosensibilitate-poliploidie la *Hordeum vulgare*. Semințele de orz diploid și autotetraploid din soiul Bonté, cu o umiditate de 12—13 %, au fost iradiate cu doze de 15 000 și 25 000 r de radiații gamma. Rezultatele au arătat că frecvența mutațiilor clorofiliene este mai mare la plantele diploide. Se modifică, de asemenea, spectrul mutațiilor la cele două nivele de ploidie. Astfel, în timp ce tipul albina, care după cum se știe este letal, este preponderent la forma diploidă, la cea tetraploidă apar mai frecvent mutante clorofiliene viabile de tip viridis, striata, maculata, tigrina etc.

Mac Key (1962) a iradiat semințe de *Triticum monococcum* ($2n = 14$), *T. dicoccum* ($2n = 28$) și *T. vulgare* ($2n = 42$), ajungînd la concluzia că radiorezistența plantelor din M_1 și frecvența mutațiilor în M_2 sporesc odată cu creșterea gradului de ploidie.

6.4. Metode de identificare a mutațiilor la plante

Identificarea mutațiilor la organismele superioare, plante și animale, este mai dificilă din cauza complexității biologice și genetice a acestora. Metodele de identificare țin seama de gradul de ploidie, modul de reproducere (sexuat sau asexuat), polenizarea (autogamă sau alogamă), structura genetică (homozigotă sau heterozigotă) etc.

Studiul comparativ al plantelor-martor și al celor tratate cu diferiți factori, fizici sau chimici, mutageni evidențiază modificări de natură anatomomorfologice (micro- sau macroscopice), biochimice și fiziologice. Astfel, se modifică aspectul plantei, forma, mărimea și culoarea frunzelor și tulpinilor, numărul de ramificații, forma, culoarea și aspectul florilor etc. Modificările biochimice și fiziologice țin de micșorarea facultății germinative a semințelor, ritmul scăzut de creștere, modificarea conținutului în zahăr, proteine, aminoacizi, pigmenți clorofilieni, pigmenți florali la plantele ornamentale etc.

6.4.1. Identificarea mutațiilor recesive în polen, endosperm și la plantele haploide

Metoda de determinare a frecvenței mutațiilor în cursul microsporogenezei la porumb (*Zea mays*, $2n = 20$) a fost elaborată de Singleton (1954). Plantele au fost iradiate, în cîmpul gamma de la Brookhaven National Laboratory, cu radiații gamma emise de o sursă de ^{60}Co.

Plantele iradiate prezentau patru gene dominante: *Su (sugary)*, plasată pe cromozomul 4 și care în stare recesivă determină apariția boabelor de porumb zaharat, *Pr* (*purple*), plasată pe cromozomul 5 și care în stare recesivă determină apariția de boabe roșii sau purpurii, *Y (yelow)*, plasată pe cromozomul 6 și în stare recesivă determină apariția de boabe albe, și *Sh* (*shrunken*), plasată de cromozomul 9, care în stare recesivă determină formarea de boabe zbîrcite. De la aceste plante s-a recoltat polen care a fost utilizat pentru polenizarea unor plante de porumb ce prezentau genele respective în stare recesivă *(su, pr, y, sh)*. Datorită fenomenului dublei fecundări, mutațiile induse la nucleii spermatici din grăunciorii de polen apăreau imediat ca modificări ale endospermului. Astfel, transformarea prin mutație a genelor dominante în alelele corespunzătoare recesive se manifestă la endosperm care prezintă tipul recesiv.

Aceste cercetări au arătat că mutantele apar mai ales datorită unor restructurări cromozomiale și mai puțin din cauza unor mutații genice. Astfel, folosindu-se linii care prezentau 4 perechi de gene alelomorfe pe cromozomul 9, în urma iradierii s-a constatat că peste 75 % din mutante pierduseră un braț al cromozomului, iar peste 95 % un segment cromozomial.

Metoda determinării mutațiilor endospermului la plante a fost elaborată de Stadler (1950) pentru identificarea mutațiilor naturale la porumb. În acest scop, se utilizează metoda lotului de încrucișare *(crossing plot method)*, cultivîndu-se în rînduri alterne plante de porumb care prezentau mai multe gene dominante și altele ce prezentau aceleași gene în stare recesivă. Plantele cu gene dominante se castrează, astfel că ele alcătuiesc genitorul femel, iar plantele cu gene recesive alele alcătuiesc genitorul mascul, raportul dintre cele două tipuri de plante fiind de 5 : 1. În acest fel, mutațiile care afectează genele recesive și determină transformarea lor în alela dominantă apar chiar în anul încrucișării la endosperm, datorită fenomenului dublei fecundări și ele pot fi urmărite la un număr foarte mare de indivizi.

Cercetările lui Stadler (1942) efectuate prin această metodă au dus la identificarea cu precizie a mutațiilor naturale ale endospermului în cazul a 8 gene diferite, care s-a dovedit că au o frecvență foarte diferită (tabelul nr. 22).

Tabelul nr. 22

Frecvența mutațiilor naturale ale endospermului la *Zea mays*

Genele	Nr. gameților femeli	Nr. mutațiilor	Frecvența mutațiilor la 10 gameți
r (*red aleurone and plant*)	554 786	273	492
Ci (*incolor endosperm*)	265 391	28	106
pr (*purple aleurone*)	647 102	7	11
su (*sugary endosperm*)	1 678 736	4	2
c (*incolor aleurone*)	426 923	1	2
y (*white kernel*)	1 745 280	4	2
sh (*shrunken kernel*)	2 469 285	3	1
wx (*waxy endosperm*)	1 503 744	0	0

Experienţele de obţinere a organismelor haploide prin o varietate de tehnici: iradierea polenului, îndepărtarea staminelor, poliembrionia, androgeneza, cultura *in vitro* a ovulelor nefecundate etc. au luat o mare amploare, organismele haploide reprezentînd un material biologic foarte preţios pentru ameliorarea plantelor. Avantajul acestor organisme decurge din structura lor genetică, mutaţia exprimîndu-se fenotipic în prima generaţie, indiferent dacă gena afectată este dominantă sau recesivă. Tratamentul cu agenţi mutageni se poate efectua asupra anterelor sau polenului pus în cultură pe mediu nutritiv, la plăntuţe sau chiar la plante haploide, care pot fi apoi diploidizate şi transformate în linii izogene.

6.4.2. Identificarea mutaţiilor la plantele autogame

Marea majoritate a mutaţiilor spontane sau induse sînt recesive şi ele se exprimă fenotipic numai dacă sînt în stare homozigotă. Frecvenţa mare şi importanţa mutaţiilor recesive pentru ameliorare au impulsionat cercetările de elaborare a unor tehnici eficiente pentru identificarea lor. Mutaţiile recesive pot fi identificate începînd cu generaţia a doua, cînd în urma segregării apar şi organisme recesive homozigote; rareori apar şi în prima generaţie cînd sînt tratate organisme heterozigote.

La plantele autogame, ovulele sînt fecundate cu polen propriu, ceea ce creează posibilitatea urmăririi descendenţilor fiecărei plante în F_1 şi F_2. De exemplu, dacă la o plantă autogamă homozigotă AA se urmăreşte identificarea mutaţiilor recesive la gameţii masculi, aceasta înseamnă că între grăunciorii de polen majoritatea sînt A şi cîţiva a, deoarece adesea grăunciorii cu gena a sînt nefuncţionali. Ovulele A fecundate cu polen a vor da naştere la plante heterozigote Aa, dar care vor avea fenotip normal datorită dominanţei lui A. Ele vor fi însă în număr mult mai mic decît cele homozigote AA. Pentru a avea siguranţa că printre plantele din F_1 pe care le urmărim se află şi plante Aa este necesară cultivarea unui număr mare de descendenţi (aproximativ 1 000) ce se vor reproduce prin autofecundare. Seminţele provenite de la fiecare din aceşti 1 000 de descendenţi din F_1 se cultivă separat pentru a obţine F_2. Dacă între cele 1 000 de plante sînt cîteva heterozigote (Aa), ele vor da prin segregare în F_2 plante homozigote aa la care mutaţia se manifestă fenotipic.

Procesul de inducere a mutantelor dominante constă în transformarea genei recesive în alelă dominantă, iar identificarea se realizează relativ uşor deoarece se manifestă fenotipic imediat, indiferent dacă se află în stare homozigotă sau heterozigotă.

Mutaţiile dominante apar în prima generaţie (M_1) dacă agenţii mutageni acţionează asupra celulelor embrionare iniţiale sau asupra zigotului. Frecvenţa mutaţiilor dominante induse în celulele germinale, depinde în special de momentul iradierii; dacă iradierea se realizează timpuriu poate rezulta un număr mai mare de gameţi mutanţi. Deoarece mutantele dominante se manifestă fenotipic în prima generaţie, identificarea lor în stare homozigotă impune testarea lor prin studiul descendenţei fiecărei mutante sau încrucişarea mutantelor cu forma iniţială. Mutantele dominante homozigote se pot izola în generaţia a treia (M_3) sau a patra (M_4) şi numai pentru mutaţiile care afectează ambii gameţi în generaţia a doua (M_2).

6.4.3. Identificarea mutaţiilor la plantele alogame

La plantele alogame, exprimarea mutaţiei recesive se realizează prin consangvinizare, în urma căreia gena recesivă afectată de mutaţie ajunge în stare homozigotă. Mutaţia se exprimă fenotipic în prima generaţie (M_1) dacă gena afectată se află în stare heterozigotă şi în generaţia a doua (M_2) sau în următoarele, dacă gena transformată prin mutaţie se află în stare homozigotă. Pentru identificarea mutantelor recesive la plantele alogame se recomandă studiul atent al descendenţilor pentru a nu se confunda mutaţia recesivă în efectul propriu-zis al consangvinizării.

Mutaţiile dominante de la plantele alogame se exprimă fenotipic în generaţia întîia (M_1), dacă agenţii mutageni acţionează asupra celulelor-mamă ale polenului şi ovulelor, sau în generaţia a doua (M_2) dacă este tratat zigotul imediat după fecundare. Pentru obţinerea mutantelor dominante în stare homozigotă la plantele alogame se recomandă folosirea consangvinizării.

6.4.4. Identificarea mutaţiilor la plantele poliploide

Identificarea şi izolarea mutaţiilor la plantele poliploide este mai dificilă din cauza modificării raportului de segregare. S-a dovedit pe cale experimentală că, la poliploizii naturali şi la cei obţinuţi artificial se modifică raportul dintre genele dominante şi recesive, se schimbă raportul genetic al acestor organisme.

Dacă ne referim la o pereche de gene alele Aa, într-un diploid există 3 posibilităţi de combinare a genelor: AA, Aa, aa, în timp ce în cazul unui autotetraploid sînt posibile 5 genotipuri, fiecare primind un nume care exprimă de cîte ori alela dominantă este reprezentată de genotipul respectiv (tabelul nr. 23).

$AAAA$	— quadruplex (A^4)	$Aaaa$	— simplex (Aa^3)
$AAAa$	— triplex (A^3a)	$aaaa$	— nuliplex (a^4)
$AAaa$	— duplex (A^2a^2)		

Tabelul nr. 23

Rezultatele autoincrucişării diferitelor genotipuri

Tipul încrucişării	Descendenţa	
	A	a
$A^4 \times A^4$	1	—
$A^3a \times A^3a$	1	—
$A^3a^2 \times A^2a^2$	35	1
$Aa^3 \times Aa^3$	3	1
$a^4 \times a^4$	—	1

În mod similar se poate deduce raportul de segregare în încrucişările $A^2a^2 \times Aa^3$, $A^3a \times Aa^3$ etc.

Dacă se ţine seama că la tetraploizi cei 4 cromozomi omologi sînt formaţi din 8 cromatide, producţia de gameţi în cazul unei combinaţii

întîmplătoare a cromatidelor este următoarea: la un genotip heterozigot simplex (*Aaaa*) se formează două tipuri de gameți 12 *Aa*: 12 *aa* sau 1 *Aa*: 1 *aa*. Dacă se consideră că cele două cromatide ce poartă alele dominante sînt întotdeauna unite prin același centromer, înseamnă că nu vor apărea niciodată în același gamet. Cele trei perechi de cromatide ce poartă alelele recesive se comportă asemănător. Dacă notăm cele 8 cromatide astfel: A_1A_2, a_3a_4, a_5a_6,a_7a_8 se constată că genele A_1 și A_2 nu pot apărea în același gamet, dar fiecare are posibilitatea egală de a se combina în același gamet cu a_3, a_4, a_5, a_6, a_7, a_8 (tabelul nr. 24).

Tabelul nr. 24

Producția de gameți la un individ simplex *Aaaa*

♀ \ ♂	A_1	A_2	a_3	a_4	a_5	a_6	a_7	a_8
A_1	—	—	A_1a_3	A_1a_4	A_1a_5	A_1a_6	A_1a_7	A_1a_8
A_2			A_2a_3	A_2a_4	A_2a_5	A_2a_6	A_2a_7	A_2a_8
a_3	—	—	—	—	a_3a_5	a_3a_6	a_3a_7	a_3a_8
a_4	—	—	—	—	a_4a_5	a_4a_6	a_4a_7	a_4a_8
a_5	—	—	—	—	—	—	a_5a_7	a_5a_8
a_6	—	—	—	—	—	—	a_6a_7	a_6a_8
a_7	—	—	—	—	—	—	—	—
a_8	—	—	—	—	—	—	—	—

Vor rezulta deci 12 *Aa* la 12 *aa* sau cu alte cuvinte raportul de segregare va fi de 1 : 1.

În cazul unui organism heterozigot *AAaa* se formează următoarele tipuri de gameți — 6 *AA* : 16 *Aa* : 6 *aa* sau 3 *AA* : 8 *Aa* : 3 *aa* (tabelul nr. 25).

Tabelul nr. 25

Tipurile de gameți la un organism heterozigote AAaa

Gameți	A	A	A	A	a	a	a	a
A	—	AA	AA	AA	Aa	Aa	A	Aa
A	—	—	AA	AA	Aa	Aa	Aa	Aa
A	—	—	—	AA	Aa	Aa	Aa	Aa
A	—	—	—	—	Aa	Aa	Aa	Aa
a	—	—	—	—	—	aa	aa	aa
a	—	—	—	—	—	—	aa	aa
a	—	—	—	—	—	—	—	aa
a	—	—	—	—	—	—	—	—

În cazul autofecundării plantelor respective, prin combinarea acestor tipuri de gameți masculi și femeli se realizează următoarele genotipuri — 9 *AAAA* : 48 *AAAa* : 82 *AAaa* : 48 *Aaaa* : 9 *aaaa*. După fenotip, segregarea se produce în raport: 187 *A* : 9 *a* (aproximativ 21 : 1), (tabelul nr. 26).

Tabelul nr. 26

Segregarea organismelor heterozigote

♀ \ ♂	3 *AA*	8 *Aa*	3 *aa*
3 *AA*	9 *AAAA*	24 *AAAa*	9 *AAaa*
8 *Aa*	24 *AAAa*	64 *AAaa*	24 *Aaaa*
3 *aa*	9 *AAaa*	24 *Aaaa*	9 *aaaa*

Dacă admitem că alela *A* determină un fenotip dominant, raportul fenotipic în F_2 va fi de 559 *A* : 224 *a* sau de 2,48 *A* : 1 *a*. Segregarea la cele trei genotipuri diferite heterozigote, la autotetraploizii autofecundați și la hibrizii dintre ei, ținînd seama de existența a 4 cromozomi omologi, respectiv a 8 cromatide, se produce ca în tabelul nr. 27.

Tabelul nr. 27

Segregarea la diferite tipuri de heterozigoți

Genotipul	Segregarea cromozomială	Segregarea cromatidică
AAAA	exclusiv *A*	exclusiv *A*
AAAa	exclusiv *A*	783 *A* : 1*a*
AAaa	25 *A* : 1*a*	20,8 *A* : 1*a*
Aaaa	3 *A* : 1*a*	2,5 *A* : 1*a*
aaaa	exclusiv *a*	exclusiv *a*
AAAa × *AAaa*	exclusiv *A*	130 *A* : 1*a*
AAAa × *Aaaa*	exclusiv *A*	51,2 *A* : 1*a*
AAAa × *aaaa*	exclusiv *A*	27 *A* : 1*a*
AAaa × *Aaaa*	1 *A* : 1*a*	7,7 *A* : 1*a*
AAaa × *aaaa*	5 *A* : 1*a*	3,7 *A* : 1*a*
Aaaa × *aaaa*	1 *A* : 1*a*	0,87 *A* : 1*a*

Din tabel reiese că la autotetraploizi, tipul recesiv apare cu o frecvență mult mai redusă decît la diploizi, la care raportul de segregare, în cazul unei perechi de alele, este de 3 : 1.

Dacă se iau în considerare două perechi de gene alele, raportul de segregare este și mai complicat. Astfel, prin autofecundarea plantelor cu genotipul *AAaa BBbb* se obțin în descendență următoarele fenotipuri: 1 225 *AB* : 35 *Ab* : 35 *aB* : 1*ab*. Se observă că acest raport de segregare se deosebește considerabil de cel întîlnit în cazul diploizilor (9 : 3 : 3 :1), tipul cu ambele caractere recesive sau cu un caracter recesiv și unul dominant manifestîndu-se cu o frecvență foarte mică.

În cazul a trei perechi de alele, fenotipul cu trei caractere recesive apare numai în proporție de 1 : 45 000.

Deși la plantele poliploide mutațiile dominante se pot manifesta fenotipic, în prima generație (M_1), izolarea lor în stare homozigotă este mai dificilă din cauza numărului mai mare de tipuri de gameți care determină modificarea raportului de segregare. Din acest motiv, în cazul în

care este afectată o singură alelă, izolarea mutației dominante poate avea loc în M_3 sau în M_4. În situația în care sînt afectate două sau trei alele, posibilitatea de a obține indivizi homozigoți apare în M_2 cu o probabilitate de 1 : 35, dacă mutația afectează două alele, și de 1 : 3, în cazul a trei alele.

Mutațiile recesive la plantele poliploide pot apărea în M_2, dar izolarea lor se poate face cu mai multă siguranță în generațiile următoare. În cazul afectării unei singure alele dominante, mutația recesivă se manifestă în M_3 cu o probabilitate de 1 : 35.

6.5. Metode de inducere și de identificare a mutațiilor la *Drosphila melanogaster*

Radu (1969) a iradiat masculi de *D. melanogaster* în vîrstă de 1—3 zile cu raze X în doze de 1 000, 2 000 și 4 000 r; s-a utilizat un aparat de 70 kV, cu filtru de aluminiu gros de 0,5 mm. Masculii iradiați au fost împerecheați cu femele impubere. S-a constatat apariția a numeroase restructurări cromozomiale: inversiuni, translocații, duplicații, deleți etc. Tudose și Brandsch (1969) au utilizat ca agent mutagen efedrina, în concentrații de 0,1; 0,5; 1,5 la 100 cm^3 apă, inclusă în mediul de cultură. S-au constatat modificări în desfășurarea ciclului vital și apariția a numeroase aberații cromozomiale.

Dacă mutațiile recesive apar în gonozomi ele pot fi detectate începînd din F_2 datorită modului de transmitere a cromozomului X. Se știe că cromozomul X al masculului se transmite femelelor din descendență, care primesc celălalt cromozom X al perechii respective pe linie maternă. În cazul producerii unei mutații recesive pe cromozomul X al genitorului patern, acesta nu va căpăta o exprimare fenotipică în prima generație, deoarece funcția lezată va fi compensată de funcția genei normale de pe cromozomul X omolog. Prima descendență femelă va fi deci purtătoarea unui cromozom X afectat. Deoarece cromozomii X ai acestor femele sînt transmiși în mod egal fiilor și fiicelor din generația a doua, apare posibilitatea identificării mutației la jumătate din masculii acestei generații datorită absenței fenomenului de alelism.

Ca exemplificare reproducem modul de transmitere a mutațiilor „white eyes" (ochi albi) la *D. melanogaster*. Mutația a fost descoperită într-o populație de indivizi de tip sălbatic cu ochi de culoare roșie. Femelele normale de tip sălbatic (Xw^+Xw^+) au fost încrucișate cu masculi mutanți (XwY). În prima generație, datorită modului de transmitere a cromozomului X, femelele devin purtătoare ale mutației (Xw^+Xw), iar masculii sînt normali (Xw^+Y). Toți acești descendenți însă, indiferent de sex, vor avea ochi de culoare roșie, culoarea dominantă. Femelele din F_1 produc ovule de două tipuri: Xw^+ și Xw. Dacă ovulele sînt fecundate cu spermatozoizi cu cromozomul Xw^+ vor rezulta, conform legilor mendeliene, 50 % femele homozigote (Xw^+Xw^+) și 50 % heterozigote (Xw^+Xw), purtătoare ale mutației. Dacă ovulele sînt fecundate de spermatozoizi cu cromozomul Y, jumătate dintre ei vor fi de tip sălbatic și jumătate vor manifesta mutația sub forma ochilor de culoare albă, deoarece la acești indivizi neomologia dintre cromozomii X și Y face imposibilă

compensarea funcției afectate prin mutație. Exprimarea fenotipică a unei gene în doză simplă a fost denumită hemizigoție.

Dintre numeroasele metode de identificare a mutațiilor heterozomale elaborate la *D. melanogaster*, vom descrie cîteva mai reprezentative.

6.5.1. Metoda non-disjuncției cromozomilor X

Una dintre numeroasele mutante descoperite la *D. melanogaster* este aceea la care doi cromozomi X nu se separă (non-disjuncție) în meioză și migrează împreună, în același gamet, ca și cum ar fi „legați". Mutanta femelă are cariotipul alcătuit din 3 perechi de autozomi plus 3 gonozomi ($\widehat{XX}Y$) și produce ovule de două tipuri: cu 3 autozomi + $\overline{XX}$ și cu 3 autozomi + Y. Încrucișată cu un mascul de tip sălbatic, această mutantă va da naștere la 4 tipuri de descendenți (fig. 20).

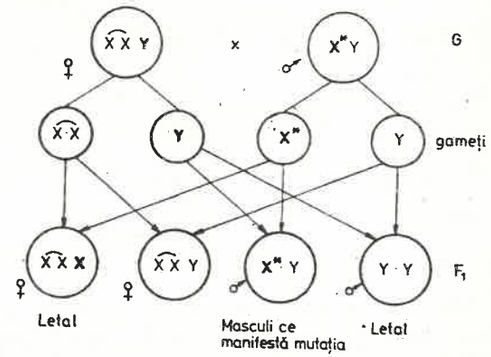


Fig. 20. — Metoda non-disjuncției cromozomilor X. Cromozomul pe care s-a produs o mutație este notat cu X*.

De obicei, femelele $\overline{XX}X$ și masculii YY nu sînt viabili. Rămîn astfel femelele $\overline{XX}Y$, asemănătoare genitorului matern, și masculii XY, normali. În mod excepțional, masculii din F_1 primesc în acest caz cromozomul X de la tată, nu de la mamă. Tocmai această particularitate este folosită în detectarea mutațiilor produse de radiații. Dacă se iradiază masculi de tip sălbatic, iar aceștia sînt încrucișați cu mutanta $\overline{XXY}$, mutația recesivă produsă prin iradiere pe cromozomul X al masculului va fi exprimată fenotipic chiar în prima generație, întocmai ca o mutație dominantă.

6.5.2. Metoda ClB

Această metodă a fost elaborată de Muller și este folosită la identificarea mutantelor recesive și letale legate de sex la *D. melanogaster*. În acest scop s-a ales o mutantă femelă care are pe un cromozom X o genă (*C*) care împiedică fenomenul de crossing-over. Legate de aceasta există alte

două gene, dintre care una letală (*l*) recesivă şi una dominantă (*B*) care determină ochi de tip bar; ultima genă este folosită ca marker în recunoaşterea mutantei. Indivizii respectivi se numesc *ClB* (fig. 21).

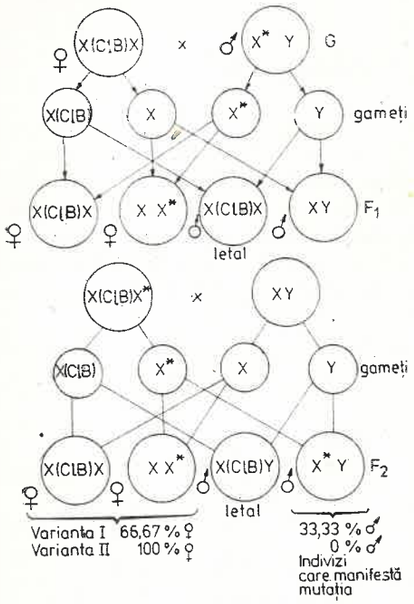


Fig. 21. — Metoda ClB la *Drosophila melanogaster*. Cromozomul pe care s-a produs o mutaţie este notat cu X*.

Mutaţia nu este exprimată fenotipic la nici unul dintre indivizii acestei generaţii. Pentru a obţine a doua generaţie se încrucişează femelele cu ochi bar din F_1, „purtătoare" ale mutaţiei, cu masculi normali. Dintre descendenţii generaţiei a doua, un interes deosebit pentru scopul urmărit îl prezintă masculii.

Indivizii masculi X(*ClB*)Y pier datorită genei letale, întocmai ca în F_1. Toţi masculii viabili au în cariotip cromozomul X al primului mascul iradiat. Dacă pe acest cromozom s-a produs o mutaţie letală, generaţia a doua vá fi formată exclusiv din femele; dacă însă mutaţia este recesivă atunci ea este exprimată fenotipic la masculi şi paralel se observă modificarea raportului dintre sexe care devine 2♀ : 1♂.

6.5.3 Metoda Muller-5

Metoda a fost elaborată pentru identificarea mutaţiilor recesive şi letale legate de cromozomul X la *D. melanogaster*. În linii mari, această metodă este asemănătoare cu cea anterioară. Mutantele homozigote cu ochi de tip *bar* (*BB*) şi de culoarea caisei ($w^a w^a$), gene localizate pe cromozomul X, alături de o genă care împiedică producerea crossing-overului (*C*),

sînt încrucişate cu masculi iradiaţi (fig. 22). Femelele heterozigote din F_1 purtătoare ale mutaţiei sînt mai departe încrucişate cu masculi normali în vederea obţinerii celei de-a doua generaţii. Ca urmare, în această

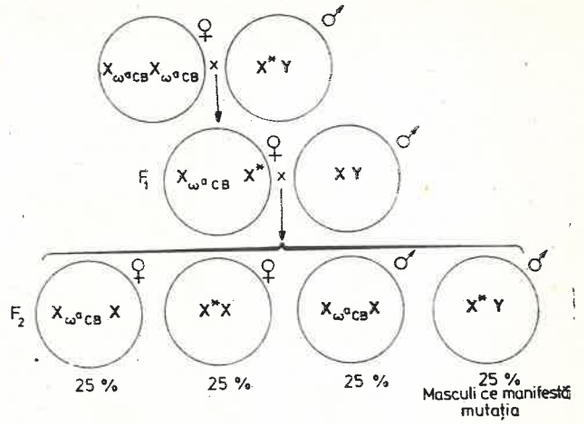


Fig. 22. — Metoda Muller-5 la *Drosophila melanogaster*. Cromozomul pe care s-a produs o mutaţie este notat cu X*.

generaţie, jumătate din masculi au ochi de culoarea caisei şi de tip bar şi jumătate manifestă eventuala mutaţie produsă prin iradiere sau pier dacă mutaţia este letală, determinînd schimbarea raporturilor dintre sexe, care devine 2 ♀ : 1 ♂.

6.5.4 Metodele Basc şi Maxy pentru identificarea mutaţiilor punctiforme

Metoda Basc, elaborată de Muller, fiind superioară metodei ClB, tinde să o înlocuiască.

Se folosesc indivizi de tip Basc, care prezintă pe cromozomul X următoarele gene: ochi de tip bar (*B*) şi de culoarea caisei (*apr*), precum şi două inversiuni paracentrice în interiorul braţului stîng al cromozomului: una mică (*In S*) şi una mare (In sc^{s1} sc^{s}). Genotipul femelei homozigote de tip Basc este următorul: sc^{s1} *B In S apr* sc^{s} / sc^{s1} *B In S apr* sc^{s}, în timp ce masculul fiind hemizigot, cuprinde aceste gene numai într-o singură doză (fig. 23). Prin încrucişarea dintre o femelă homozigotă Basc şi un mascul tip sălbatic în prima generaţie se obţin femele heterozigote (+ / sc^{s1} *B IN S apr* sc^{s}), la care nu este posibil crossing-overul între cromozomii X din cauza existenţei celor două inversiuni paracentrice. Ca urmare, ele transmit la descendenţii din F_2 cîte un cromozom X de origine maternă şi unul de origine paternă.

Prin încrucişarea femelelor heterozigote din F_1 cu fraţii lor heterozigoţi de tip Basc, în F_2 apar 50 % femele Basc şi 50 % femele normale, dar heterozigote. Masculii din F_2 vor fi jumătate de tip Basc heterozigoţi şi jumătate de tip sălbatic. Dacă la încrucişarea iniţială se folosesc masculi normali iradiaţi, la care s-au produs mutaţii letale recesive pe cromozo-

mul X, femelele din F_1 supraviețuiesc pentru că sînt heterozigote. În F_2 însă, masculii de tip sălbatic, fiind hemizigoți, manifestă această genă și, ca urmare, pier înainte de maturitate. Absența lor arată existența mutațiilor letale recesive produse prin iradiere pe cromozomul X. Este extrem de ușor să se determine în F_2 absența masculilor de tip sălbatic din cei 80—100 descendenți ai unei femele.

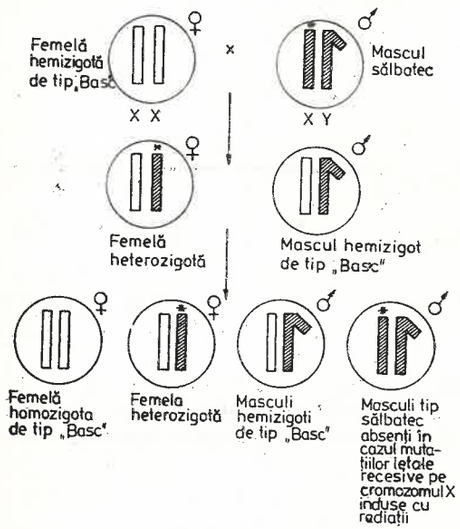


Fig. 23. — Metoda Basc la *Drosophila melanogaster:* Cromozomul pe care s-a produs o mutație este notat cu X*

Cu ajutorul acestei metode este posibilă, de asemenea, depistarea mutantelor letale recesive care pot apărea natural pe cromozomul X la femelele de tip *Basc.* În acest caz, în F_2 sînt absenți masculii de tip Basc. La *D. melanogaster*, frecvența mutațiilor naturale letale recesive este de 0,2 %, iar la materialul iradiat de 3,1 % pentru fiecare 1 000 r.

Metoda *Basc* poate fi folosită și pentru identificarea mutantelor semiletale, fenomen care poate fi pus în evidență prin micșorarea frecvenței masculilor de tip sălbatic în F_2 sau prin reducerea viabilității lor. În ceea ce privește evidențierea mutantelor morfologice, metoda poate fi folosită, dar prezintă erori provocate de prezența simultană a mutantelor morfologice și a celor letale pe cromozomul X. Ca urmare, indivizii cu gene letale pier și nu pot fi evidențiate mutantele morfologice.

Metoda Maxy este folosită pentru punerea în evidență a mutațiilor punctiforme recesive morfologice, fiind în acest sens superioară metodei Basc. Femelele de tip Maxy prezintă 15 mutații punctiforme recesive pe cromozomul X și sînt heterozigote. De asemenea, femelele respective prezintă inversiuni paracentrice pe cromozomul X care împiedică crossing-overul și mențin întocmai cromozomul X de-a lungul generațiilor. Identificarea mutațiilor punctiforme se realizează urmărindu-se apariția indivizilor care prezintă unul sau mai multe caractere recesive din cele

15. Aceasta înseamnă transformarea prin mutație a genei normale în corespondenta ei recesivă de pe cromozomul X, fapt care determină apariția caracterului respectiv (în stare homozigotă).

Trebuie subliniat că aproximativ 10 % din mutantele punctiforme recesive determinate prin metoda Basc, care sînt letale în stare hemizigotă, prezintă și unele efecte morfologice în stare heterozigotă. De asemenea, o parte din mutantele morfologice punctiforme identificate prin metoda Maxy sînt letale în stare hemizigotă.

6.5.5. Metoda genelor letale balansate

Identificarea mutațiilor recesive de pe autozomi este mai dificilă și necesită un volum mare de lucru. În această privință *D. melanogaster* s-a dovedit, odată în plus, a fi un obiect excelent de cercetare (fig. 24). Se folosesc indivizi heterozigoți care prezintă pe cromozomul 2 trei mutații *Curly* (*Cy*), mutație dominantă ce modifică forma aripilor, *Plum* (*Pm*), mutație dominantă ce determină culoare brună a ochilor, și *Lobe* (*L*), mutație dominantă ce determină ochi lobați. Deoarece tipul homozigot este letal, indivizii exprimînd aceste 3 caractere sînt toți heterozigoți (*Cy + L/+ Pm +*).

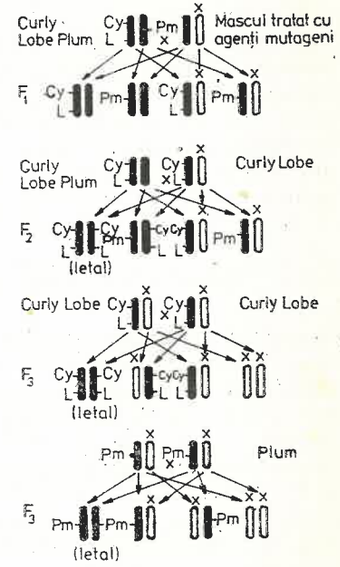


Fig. 24. — Metoda genelor letale balansate. Autozomul II pe care s-a produs o mutație este marcat cu o steluță.

Metoda constă în următoarele: se încrucișează femelele de tip *Curly Lobe Plum* heterozigote cu masculi iradiați. În F_1 se selecționează indivizi fie *Curly Lobe* (*Cy + L/+++*), fie *Plum* (*+Pm +/+++*), care se retroîncrucișează (backcross) cu tipul *Curly Lobe Plum.* În F_2 rezultă 25 % indivizi homozigoți care pier (*Cy + L/Cy+L*), 25 % *Curly Lobe Plum* (*Cy + L/+Pm+*), 25 % *Curly Lobe* (*Cy+L/+++*) și 25% *Plum* (*+Pm+/+++*). Din această generație se selecționează din nou indivizi fie *Curly*, fie *Plum* și se încrucișează între ei. În primul caz, al încrucișării indivizilor *Curly* × *Lobe*, în F_3 se observă că 25 % dintre descendenți pier din cauza homozigoției genei letale (*Cy + L/Cy + L*), restul indivizilor fiind repartizați după cum urmează: 2/3 *Curly Lobe* și 1/3 normali. Dacă prin iradiere s-a indus o mutație letală pe cromozomul 2 atunci în F_3 nu vor apărea decît indivizi *Curly Lobe*. În cazul unei mutații recesive, treimea de indivizi normali va manifesta caracterul modificat prin mutație.

Observații similare s-au făcut în cazul încrucișării între ei a indivizilor *Plum* (*+Pm+/+++*).

6.6. Metode de identificare a mutațiilor la mamifere

Cercetările efectuate la șoareci au arătat că mutațiile recesive autozomale la mamifere nu sînt exprimabile fenotipic decît în F_3 și atunci cu o probabilitate redusă.

Presupunînd că o femelă a suferit consecutiv iradierii o mutație recesivă (*A* s-a transformat în *a*), din cele n ovule pe care le produce unul singur va fi afectat de mutație. Dacă toate ovulele ar fi fecundate cu spermatozoizi normali pentru gena (*A*) considerată, prima generație s-ar compune din n — 1 indivizi normali (*AA*) și un individ purtător al mutației (*Aa*). Spre simplificare, presupunem că acest purtător este mascul. Pentru a detecta acest individ trebuie încrucișați toți masculii din F_1 cu femelele acestei generații. Masculii normali vor da în descendență numai indivizi normali. Individul *Aa* va produce, de asemenea, descendenți fenotipic normali, dar dintre aceștia jumătate vor fi heterozigoți (*Aa*). În F_2 se încrucișează din nou toți masculii și femelele între ei sau se face un backcross, dacă acest lucru este posibil, adică dacă toți masculii din F_1 sînt încă vii și apți pentru reproducere.

Cum nimic nu permite recunoașterea heterozigoților în F_2 se pot încrucișa $AA \times AA$, $AA \times Aa$ și $Aa \times Aa$. Dintre aceste cupluri posibile, numai ultimul poate da în F_3, conform legilor mendeliene, 25 % indivizi în care mutația să fie exprimată fenotipic (*aa*). Dacă prin backcross femelele din F_2, purtătoare ale mutației (*Aa*), au șansa de a fi fecundate de masculi heterozigoți din F_1 (*Aa*), se ivește o nouă cale de manifestare a mutației în F_3. Intervenția hazardului în aceste studii obligă însă la un număr mare de încrucișări și o perioadă lungă.

6.6.1. Metoda locusului specific

O metodă interesantă elaborată de Russell pentru identificarea și stabilirea frecvenței mutațiilor la mamifere este metoda locusului specific. Ea constă, în esență, în următoarele: un individ de tip sălbatic este iradiat și apoi încrucișat cu un individ-test multiplu recesiv. În F_1, în mod normal, caracterele recesive nu se manifestă fenotipic. Dacă însă una dintre genele dominante suferă o mutație, aceasta poate fi evidențiată în F_1, prin apariția de caractere recesive. Din păcate metoda este limitată la un număr de mutații care nu afectează în mod vizibil funcția reproductivă sau viabilitatea organismelor.

Russell a folosit o linie homozigotă de șoareci pentru următoarele 7 gene recesive: *non-agouti* (*a*), *brown* (*b*), *chinchilla* (c^{ch}), *dilute* (*d*), *pink-eyes* (*p*), *piebald* (*s*) și *shortear* (*se*). Masculii avînd cele 7 gene dominante corespunzătoare au fost iradiați. În ipoteza că animalele iradiate au suferit o mutație a unora dintre aceste gene, atunci această mutație trebuie să se manifeste la descendenți. În experiența lui Russell, în F_1 a apărut un număr mic de indivizi cu 1—7 caractere recesive alături de majoritatea descendenților cu caractere dominante. S-a demonstrat astfel că frecvența mutațiilor per locus, care apar consecutiv iradierii, este pronunțat mai mare decît a celor naturale.

În cazul că mutațiile induse prin iradiere sînt letale recesive, în F_2 pot ajunge în stare homozigotă și astfel determină moartea a 25 % din descendenți. Locusul cu cea mai mare frecvență a mutațiilor letale recesive este *piebald* (*s*), care poate atinge 100 %, în timp ce la celelalte gene rata mutațiilor letale recesive variază între 50 și 100 %.

6.6.2. Metoda iradierii embrionilor heterozigoți

Russell și Mayer (1957) au elaborat această metodă ingenioasă de studiu al mutațiilor somatice ce afectează culoarea blănii la șoareci prin iradierea femelelor gestante într-o anumită perioadă de dezvoltare embrionară sau fetală și examinarea animalelor adulte cu fenotip mozaicat.

Autorii au lucrat cu 3 serii de animale: 1) o serie heterozigotă pentru 4 gene: *piebald* (*s*), *chinchila* (c^{ch}), *dilute* (*d*) și *brown* (*b*), care a fost iradiată; 2) o serie formată din indivizi homozigoți pentru aceleași gene, de asemenea iradiată, care a servit la diferențierea anomaliilor celulare pigmentare datorită mediului de cele de natură genetică; 3) o serie de animale neiradiate, care au servit drept control. Embrionii au fost iradiați cu doze de 100 r (suficient de scăzută pentru a înlătura efectul letal, dar satisfăcătoare în ceea ce privește inducerea de mutații). Animalele au fost studiate începînd din a 32-a zi pînă în a 58-a zi a dezvoltării postnatale. În acest interval s-au eliminat toți indivizii cu fenotipul nemozaicat. Animalele mozaicate au fost menținute sub observație timp de 10 săptămîni pentru a se putea face dovada caracterului genetic persistent al mozaicului.

Datele statistice au arătat că incidența mozaicurilor la animalele heterozigote iradiate a fost de 11 %, iar la cele neiradiate de numai 0,5 %. Caracterul genetic al modificărilor a fost confirmat și de distribuția randomizată a animalelor mozaicate.

7 Metode de testare a potențialului mutagen al diferitelor substanțe chimice la mamifere și plante

Problemele implicate în estimarea capacității mutagene a unor agenți din mediu sînt multiple. În primul rînd trebuie să se determine dacă agentul respectiv este mutagen sau nu. Cel mai mare risc genetic îl prezintă substanțele care produc mutații genice. Evident că o primă indicație asupra potențialului mutagen al unei substanțe poate fi obținută prin folosirea testelor pe bacterii sau alte microorganisme. În al doilea rînd, prin tehnica probei mediate de gazdă se poate demonstra activarea sau inactivarea metabolică a compusului respectiv în animalul-gazdă. Proba este reprezentată de o bacterie sau chiar celule de mamifer în cultură, care sînt introduse în corpul unui mamifer (de obicei un rozător) și apoi tratat cu substanța luată în studiu ; după un anumit timp, celulele introduse sînt extrase și analizate pentru detectarea de mutații.

Cele mai multe sisteme-test vizează depistarea perturbărilor la nivelul cromozomilor. Se pune problema în ce măsură aberațiile cromozomiale pot fi indicator al unei activități mutagene și care este limita de la care acestea reprezintă un risc genetic. Se știe că există substanțe care produc numai ruperea cromozomilor, fără rearanjamente, cum sînt fenolii în celulele plantelor sau cafeina în celulele animalelor. În acest caz nu este vorba de un risc genetic, deoarece celulele respective vor pieri în următoarele diviziuni mitotice. Dar, cînd apar astfel de fragmente în celulele germinative, riscul genetic este foarte mare, deoarece acestea se transmit și duc la moartea zigotului într-un stadiu timpuriu. Cînd însă ruperea cromozomilor este urmată de rearanjamente între cromozomi (de ex. translocații) există un risc genetic, deoarece nu se produce moartea celulelor și apar indivizi anormali.

Corelarea între posibilitatea unui agent de a produce mutații genice, pe de o parte, și rearanjamente cromozomiale, pe de altă parte, este ultima etapă în stabilirea potențialului mutagen, dar și cea mai dificilă. Rearanjamentele cromozomiale pot fi însoțite și de pierderea de mici fragmente cromozomiale, care reprezintă, de fapt, pierderea funcției unei gene sau a cîtorva gene implicate. Corelația între capacitatea mutagenă și cea de a produce ruperi cromozomiale este nesemnificativă atunci cînd se face pe organisme diferite și chiar atunci cînd se face pe același organism. De ex., dietilsulfatul este un mutagen foarte puternic la *Drosophila melanogaster*, dar nu produce translocații. Unul dintre cele mai promițătoare sisteme-test pentru a efectua astfel de corelații este cel care folosește aceeași

celulă de mamifer, ori în cultură, ori în proba mediată de gazdă (de ex. celulele limfomului de șoarece).

Determinarea relației doză-efect în estimarea capacității mutagene a unei substanțe la concentrații fiziologice este dificilă și poate fi influențată de mulți factori. Astfel, doza reală depinde de puterea de penetrație a substanței, de răspîndirea ei în organism, de degradarea și combinarea ei cu alte substanțe decît ADN. În funcție de aceștia, concentrațiile mari pot da rezultate pozitive false, iar concentrațiile mici inactivate metabolic pot reflecta efectele reale. Specificitatea răspunsului în funcție de animalul-test reprezintă un factor de care trebuie să se țină seama în aprecierea efectului mutagen și în extrapolarea studiilor la om.

În anul 1972, Societatea pentru Studiul efectelor mutagene ale mediului și Institutul de cercetări medicale din S.U.A. au elaborat o metodologie specială („Chromosome methodologies in mutation testing") în care sînt descrise 20 de teste pentru determinarea potențialului mutagen al substanțelor chimice. Deoarece nu există un singur test sau o serie de teste ideale care pot fi recomandate pentru caracterizarea tuturor agenților mutageni, alegerea testelor în diferite studii nu este impusă, ci rămîne la decizia cercetătorului, în funcție de materialul și scopul urmărit. În felul acesta pot fi elaborate continuu noi teste mai rapide și mai eficiente. Pentru testarea unei substanțe este necesară folosirea a 2—3 teste pentru corelarea datelor și pentru evidențierea răspunsului specific al diferitelor tipuri de celule.

În general însă, metodele de testare genetică pentru substanțele chimice trebuie să îndeplinească mai multe condiții :

— să fie sensibile încît să poată determina o creștere redusă a ratei mutațiilor,

— să folosească un material biologic corespunzător încît rezultatele să poată fi extrapolate la specia umană,

— să nu fie scumpe și să poată fi realizate cu ușurință de personalul laboratorului,

— să poată determina capacitatea mutagenă directă și indirectă (după metabolizarea în organism) a diverselor substanțe chimice,

— să poată determina atît mutațiile ce afectează celulele liniei germinale, cît și pe cele somatice. În felul acesta se poate diferenția capacitatea mutagenă de cea teratogenă și carcinogenă.

7.1. Teste pentru mutageneză utilizate la mamifere

La mamifere, testarea unor substanțe chimice este corelată cu activarea sau inactivarea lor metabolică. Numai celulele mamiferelor, prin aparatul lor enzimatic complex, sînt capabile să activeze sau să inactiveze substanțe mutagene denumite *promutageni*. De pildă, promutagenul N-acetil-2-amino-fluorena este mai întîi convertit în N-acetoxi-N-acetil-2-amino-fluorenă și apoi în N-hidroxi-N-acetil-2-amino-fluorenă ; numai forma finală reacționează cu macromoleculele de ADN. Iată de ce capacitatea mutagenă, teratogenă și carcinogenă a diverselor substanțe se testează

în ultimă analiză numai cu ajutorul unor metode în care este utilizată celula de mamifer *in vivo* sau *in vitro*. Desigur, metodele aplicate *in vivo* sînt preferabile, deoarece astfel poate fi testată în același timp și capacitatea mutagenă a metaboliților agentului mutagen respectiv. Se poate întîmpla ca, în timp ce agentul studiat este capabil să rupă cromozomii, metaboliții săi să nu producă rupturi cromozomiale și invers.

Dintre metodele de testare folosite la mamifere vom descrie numai cîteva, valabile pentru extrapolarea la om și ușor de manipulat în orice laborator cu un minimum de dotare.

7.1.1. Testul culturilor celulare

Prin această tehnică, cunoscută de peste 30 de ani, pot fi cultivate și crescute *in vitro*, ca și microorganismele, celule de mamifer (primate, rozătoare etc.) sau de om. Pot fi cultivate *in vitro* linii celulare diploide umane din diferite țesuturi și organe: piele, membrane, măduvă osoasă și leucocite, sînge periferic. În ultimii 10 ani aceste metode, care au înregistrat progrese substanțiale, sînt folosite în inducerea de mutații genice, comparat cu mutațiile induse *in vivo*, în determinarea mecanismelor de imunitate și îmbătrînire, în testarea potențialului mutagen al diferitelor substanțe chimice, medicamente etc.

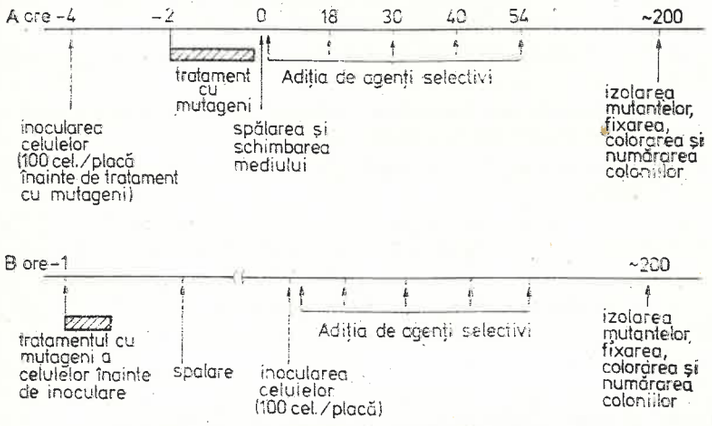


Fig. 25. — Modele experimentale pentru inducerea mutațiilor în culturi de celule de mamifere. Tratamentul cu agenți mutageni se face după (A) sau înainte (B) de inocularea celulelor (modelele sînt aplicabile atît în mutageneza fizică, cît și în cea chimică).

Acest test se bazează pe faptul că în culturile de celule cu o constituție genetică bine cunoscută, sub influența unor substanțe chimice introduse temporar în mediul de cultură, este posibilă izolarea și selecția unor mutante ce prezintă anumiți markeri morfologici, biochimici, serologici etc. (fig. 25). Desigur, fiind vorba de celule somatice, agenții ce

induc mutații nu pot fi considerați în mod obligatoriu mutageni și pentru celulele germinale. Cu ajutorul acestui test s-a evidențiat, de pildă, că anumite substanțe chimice inactive la microorganisme induc mutații în culturile celulare. Acest test este utilizat și pentru evidențierea fenomenului de transformare celulară cu ajutorul diferiților carcinogeni cunoscuți sau potențiali (Chu și colab., 1970).

Tehnicile propriu-zise de cultivare a celulelor de mamifere sînt prezentate în capitolul 3.

7.1.2. Testul letalelor dominante (DL-test)

Acest test, elaborat de Bateman (1966) și Epstein (1970), se folosește pentru identificarea unor modificări puternice în celulele germinale și îndeplinește cele mai importante condiții pentru testarea mutagenilor: este simplu, rapid, iar datele pot fi utilizate în aprecierea acțiunii mutagenilor asupra organismului uman.

Tehnica de lucru: se tratează grupe de 20 — 30 de masculi, în vîrstă de 8—10 săptămîni, intraperitoneal sau oral, cu agentul testat; un grup similar de masculi servește ca martor. După 6 ore de la tratament, fiecare mascul se împerechează cu o femelă virgină netratată, în vîrstă de 10—16 săptămîni. Apoi se examinează zilnic femelele, iar cele găsite gestante sînt înlocuite cu altele virgine, operația repetîndu-se timp de 8 săptămîni. Femelele gestante se sacrifică după 12—15 zile de la împerechere, iar estimarea mutațiilor letale dominante se face ținîndu-se seama de numărul total și de cel viabil de implantări embrionare per femelă. Cu lotul martor se procedează la fel. Se folosește următoarea formulă:

$$DL(\%) = 1 - \left(\frac{\text{nr. de implantări viabile/femele în experiență}}{\text{nr. de implantări viabile/femele martor}} \right) \times 100.$$

În cazul unor agenți mutageni puternici, mutația letală dominantă provoacă moartea individului heterozigot, care conține gena respectivă mutantă într-o singură doză. Responsabile pentru producerea de mutații letale dominante sînt aberațiile cromozomiale ca: rupturi cromozomiale manifestate prin punți și micronuclei, deleții, translocații, monosomie și trisomie. Astfel de modificări cromozomiale nebalansate în gameți duc la moartea embrionului la scurt timp după implantare.

Ca urmare se constată:

— reducerea numărului total și a celor viabile de implantări;

— mărirea proporției de mortalitate a embrionilor implantați per femelă;

— reducerea frecvenței împerecherilor fertile.

La sfîrșitul experimentului se sacrifică masculii, examinîndu-se histologic testiculele și realizîndu-se totodată studiul meiozei.

Trebuie adăugat că acest test se aplică, de obicei, împreună cu alte teste citogenetice pentru mutagenitatea *in vivo*, cum sînt analiza cariotipului în măduva osoasă și testul probei mediate de gazdă.

În experiențele realizate de Mather, Tsuchimoto și Deyssenroth (1978) s-a încercat comparativ mutagenul trietilenmelamina (TEM) și

medicamentul hidergin. S-a constatat că trietilenmelamina are efecte semnificative în mărirea frecvenţei letalelor dominante, în timp ce medicamentul testat la doze mari, dar subtoxice, nu produce efecte; medicamentul folosit în doze terapeutice la om (20—60 μg/kg zilnic) nu reduce fertilitatea şi nu provoacă aberaţii cromozomiale majore.

★

Tehnicile folosite pentru analiza citogenetică a efectului unor substanţe potenţial mutagene sau potenţial protectoare sînt cele specifice pentru studiul cromozomilor în mitoză, *in vivo* sau *in vitro*, la mamifere. Citǎm cîteva: tehnica preparării cromozomilor din măduva hematopoetică (Tjio şi Whang, 1962), testul micronucleilor (Schmid şi Boller, 1970), testul SCE (Miltenburger, 1979), tehnica culturii de leucocite (vezi cap. 3), tehnica culturii de fibroblaste (Harnden, 1960) şi tehnica culturii de celule din lichid amniotic (Lisgar şi colab., 1970). O parte din aceste tehnici fiind descrise în detaliu în capitolul 3, vom expune numai analiza citogenetică în mitoză, testul micronucleilor, testul SCE şi analiza citogenetică în meioză.

7.1.3. Analiza citogenetică în mitoză

În testele pentru analiză citogenetică *in vivo* sistemele celulare cele mai folosite sînt măduva osoasă, din care se obţin informaţii asupra mitozei, şi gametociţii (spermatocite şi oocite), din care se obţin informaţii asupra meiozei.

În testele pentru analiză citogenetică *in vitro* se folosesc adesea cultura de limfocite şi cultura de fibroblaste. Cultura de limfocite permite studiul efectelor agenţilor chimici asupra fazei G_1 a ciclului mitotic, deoarece aceste celule cu viaţă lungă se află toate în faza presintetică în sîngele circulant. Cultura de fibroblaste (din piele) permite demonstrarea efectelor pe termen lung, deoarece de la inocularea agentului în cultură pînă la posibilitatea efectuării analizei citogenetice trec multe generaţii celulare.

Există posibilitatea studierii efectelor mutagene şi asupra descendenţilor organismelor tratate. Tehnica folosită în acest scop (amniocenteză) constă în cultivarea pe mediu a celulelor fetale din lichidul amniotic. La om se poate aplica după 12 săptămîni de sarcină.

În mînuirea tehnicilor de analiză citogenetică, în scopul obţinerii unor rezultate corecte, este necesar să se ţină seama de un protocol-standard:

— Datorită complexităţii răspunsului celulei de mamifer sub influenţa unor agenţi din mediul extern este necesar să se lucreze paralel cu probe tratate şi cu probe martor. Dacă se lucrează *in vitro* probele martor trebuie obţinute de la acelaşi donor, iar dacă se studiază *in vivo* indivizii martor trebuie să fie de acelaşi sex, vîrstă şi linie cu cei trataţi. Trebuie să se folosească soluţii şi medii care provin din acelaşi stoc, în aceleaşi cantităţi şi să se lucreze în acelaşi timp. De asemenea, pentru studiile *in vitro* uneori se mai foloseşte, în afară de martorul netratat, şi un martor tratat cu un agent ale cărui efecte pe cromozomi se cunosc foarte bine.

— Uneori, un experiment trebuie repetat din cauza lipsei de diviziuni, repetiţia făcîndu-se exact în aceleaşi condiţii. Este bine ca aceleaşi lame să fie citite de două persoane, pentru compararea şi siguranţa rezultatelor.

— Îndoielile asupra acurateţii datelor citogenetice obţinute pot fi înlăturate lucrîndu-se numai pe lame mascate, adică cel ce efectuează analiza citogenetică să fie pus în situaţia de a nu şti ce probă analizează la microscop: martor sau tratat, altfel el poate fi influenţat, căutînd celule cu aberaţii sau celule normale.

— Pentru analiza aberaţiilor trebuie urmat un procedeu standardizat, astfel încît pe fiecare lamă să se citească un număr mic de celule, să se citească mai multe lame şi să nu se aleagă celulele. Uneori apar probleme privind distincţia între rupturi cromatidice şi goluri. Este bine ca fiecare citogenetician să-şi stabilească criteriul său personal de apreciere, dar cel mai simplu este să se facă deosebirea între rupturi aliniate şi nealiniate decît între rupturi continue şi discontinue. Dacă în cursul analizei citogenetice apar tipuri noi de aberaţii trebuie să se reia citirea lamelor de la început.

—Există mai multe sisteme de clasificare a aberaţiilor cromozomiale (Revell, 1955, 1959; Evans, 1962), uneori alcătuite pe baza modului lor de formare (Kihlman, 1966). Majoritatea aberaţiilor sînt consecinţe ale ruperii cromozomilor şi reunirii capetelor rupte. Sînt trei posibilităţi de refacere a rupturilor: aberaţii cromozomiale, cromatidice şi restituţii, care sînt cele mai frecvente. Deosebirea dintre primele două categorii se face mai greu în metafază, dar în anafază distincţia este clară (Kihlman, 1966). În ultimă analiză, important este dacă agentul induce sau nu aberaţii şi dacă acestea sînt de natură să influenţeze descendenţa.

— În afară de tipurile de aberaţii rezultate în urma ruperii cromozomilor, citologic mai pot fi observate şi perturbări de altă natură: modificarea indicelui mitotic, a gradului de ploidie şi apariţia de nuclei şi cromozomi picnotici.

— În studiul aberaţiilor cromozomiale una din problemele urmărite este şi localizarea rupturilor cromozomiale. Există numeroase cercetări care atestă localizarea neîntîmplătoare a aberaţiilor, atît de-a lungul unui cromozom, cît şi pe anumiţi cromozomi din complement, şi faptul că regiunile cromozomiale rupte preferenţial sînt cele bogate în heterocromatină (constricţii secundare, centromeri etc.). Datorită faptului că regiunile heterocromatinice sînt afectate preferenţial de majoritatea agenţilor exogeni, se pune întrebarea dacă nu cumva această specificitate nu constă mai degrabă în sensibilitatea mărită a acestor regiuni decît în specificitatea agentului studiat. De aceea, în scopul înţelegerii structurii şi funcţiei diferitelor regiuni în interiorul cromozomului ar fi utilă găsirea unor agenţi care să afecteze preferenţial regiunile eucromatice ale cromozomilor.

— Încercarea de a stabili indirect momentul cînd agentul studiat a modificat structura cromozomului este un alt obiectiv în determinarea modului său de acţiune. Aberaţiile pot fi cromatidice sau cromozomiale, după momentul în care se produc rupturile în cursul ciclului mitotic (fig. 26). Teoretic, dacă ruperea a avut loc în G_1, cînd cromozomul este o singură entitate, în metafaza următoare se pot observa rupturi izocromatidice, deci aberaţii de tip cromozomial. Dacă ruperea a avut loc în G_2, cînd cro-

mozomul este bicromatidic, în metafaza imediat următoare aberațiile sînt de tip cromatidic.

Agenții care afectează cromozomul profazic produc aberații subcromatidice. Nu este ușor de stabilit momentul cînd se produc aberațiile cromozomiale, deoarece pentru aceasta sînt necesare culturi de celule cu diviziune sincronă. Or, se știe că prin diferite metode de sincronizare

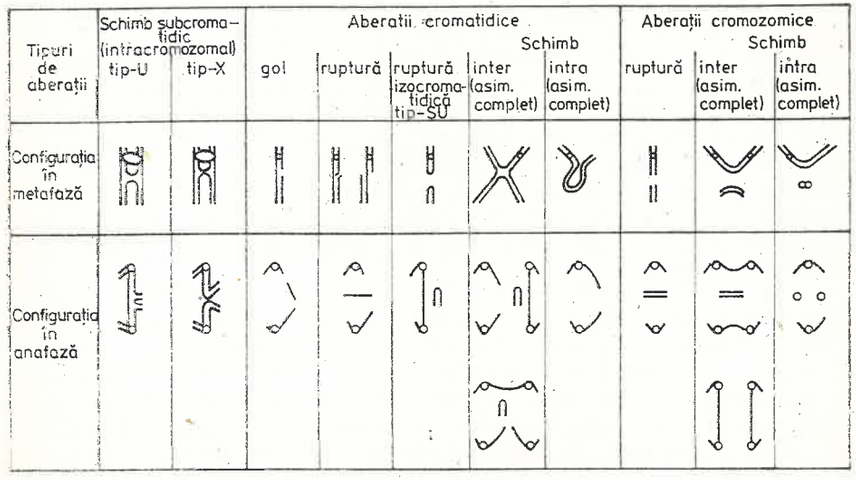


Fig. 26. — Principalele tipuri de aberații cromozomiale induse de diferite substanțe chimice (după Kihlman, 1966).

nu se obțin mai mult de 1—2 cicluri de sincronizare. Culturile de leucocite din sîngele periferic au fost cel mai mult folosite pentru astfel de studii. Dar, și în acest caz, intervine problema duratei de menținere a culturii; de obicei, depistarea aberațiilor se face după 72 de ore de cultură, cînd celulele se pot găsi în al doilea sau al treilea ciclu de diviziune.

În funcție de momentul cînd a fost administrat agentul mutagen, efectele pot fi diferite. De exemplu, leziunile produse în G_2 apar în prima mitoză după tratament ca rupturi cromatidice și în a doua mitoză ca rupturi izocromatidice, deci aberații de tip cromozomic. În concluzie, trebuie folosite culturi sincrone de celule sau culturi de leucocite în care efectul se stabilește în prima diviziune (48 de ore).

O tehnică care dă rezultate bune privind momentul interacției cromozom — agent mutagen este cea a autoradiografiei. Prin marcarea unor agenți posibil mutageni cu izotopi radioactivi (^3H, ^{14}C și ^{35}S) se pot face corelații între tipul de aberație cromozomială, pe de o parte, și locul și momentul de acțiune a agentului, pe de altă parte.

7.1.4. Testul micronucleilor

Acest test a fost pus la punct independent de Schmid și Boller (1970) pentru substanțe chimice și de Heddle (1973) pentru radiații. Metoda

se bazează pe observația că toate aberațiile cromozomiale, cu excepția inversiunilor și translocațiilor, au un fragment acentric. Din cauză că aceste fragmente fără centromeri nu se pot deplasa la poli, cu ajutorul fusului nuclear, sînt frecvent pierdute și nu sînt incluse în nucleii celulelor-fiice, formînd micronuclei în citoplasma acestor celule. Micronucleii pot rezulta, de asemenea, și din cromozomii retardatari și în urma fenomenului de aneuploidie. Micronucleii pot fi găsiți în celulele măduvei osoase de la animalele tratate cu radiații sau substanțe chimice.

Micronucleii sînt numărați atît în celulele nucleate cît și în eritrocite policromatofile, iar numărul celulelor aberante cu micronuclei se raportează la numărul total de celule numărate (Stoian și Raicu, 1980).

Dintre avantajele ce le prezintă acest test citățm următoarele:

— Aberațiile care se produc pe tot parcursul unui ciclu mitotic pot fi identificate în interfază, deoarece micronucleii în această fază însumează toate aberațiile.

— Pot fi folosite și doze mai mari de agenți mutageni sau de substanțe protectoare deoarece nu se pune problema analizei metafazelor, care în cazul aplicării unor tratamente mai drastice devin dificil de analizat.

— Testul micronucleilor se corelează, în condiții experimentale identice, cu testul mutațiilor letale dominante și cu analiza aberațiilor cromozomiale detectate în metafază.

— În cazul cînd testul micronucleilor este negativ, acesta poate dovedi următoarele: ori agentul mutagen are o activitate mutagenă slabă, ori nu ajunge la celule, ori produce numai mutații punctiforme.

— Testul micronucleilor poate fi aplicat și la animale la care numărul mare de cromozomi creează dificultăți inerente în analiza corectă a aberațiilor cromozomiale în metafază.

Tehnica de lucru: se folosesc 4—5 animale per variantă. Sacrificarea se face după 24 de ore de la tratament, interval aproximativ egal cu un ciclu mitotic după care micronucleii pot fi găsiți în interfază. La animalele anesteziate cu eter se scoate măduva femurală cu ajutorul unui ac și se pune rapid pe o lamă, sub formă de amprente sau linii drepte. După uscare, lamele se colorează cu May-Grünwald-Giemsa: 3 minute în May-Grünwald, 1 minut în apă deionizată și 30 minute în Giemsa 10%. Pentru fiecare animal se fac 3—4 lame și pe fiecare lamă se citesc cel puțin 400 de celule. Prin această metodă se realizează o colorație diferențiată a celulelor măduvei osoase și micronucleii pot fi văzuți clar. Rezultatele se interpretează statistic.

7.1.5. Testul schimburilor între cromatidele-surori (SCE)

Una dintre cele mai interesante tehnici de citogenetică folosită în ultimii ani este tehnica schimburilor între cromatidele-surori (SCE, „sister chromatid exchange"). Prin această tehnică, cele două cromatide-surori ale unui cromozom se pot deosebi una de alta prin colorare diferențiată. Tehnica se bazează pe faptul că după două cicluri de replicare în prezența bromdezoxiuridinei (BUdR), cromozomii au o cromatidă în care ADN

a încorporat, în locul timinei, 5-bromuracil într-o singură catenă (cromatidă-TB) și o cromatidă în care ADN a încorporat 5-bromuracilul în ambele catene (cromatidă-BB). Colorarea cromatidelor se face diferențiat, deoarece proprietățile de colorare ale cromozomilor sînt alterate cînd timina din ADN este înlocuită prin 5-bromuracil. Astfel, cromatida-BB se colorează mai slab decît cromatida-TB, iar cromatida TB, la rîndul său, nu se colorează atît de puternic ca o cromatidă în care nu a avut loc nici o substituție (cromatidă-TT) (fig. 27).

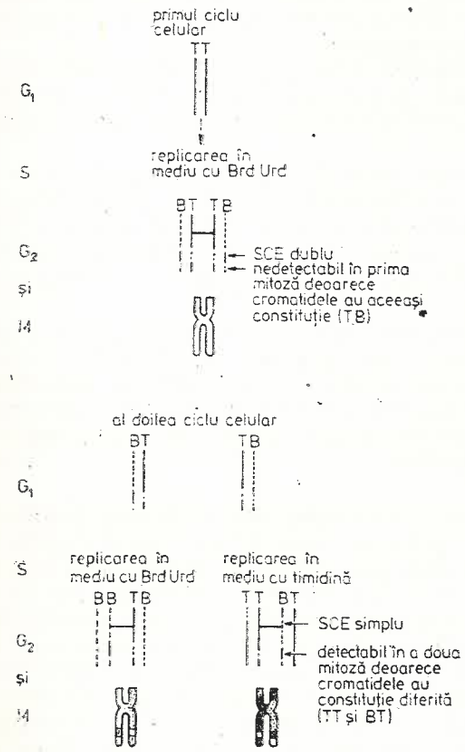


Fig. 27. — Demonstrarea schematică a principiului tehnicii de marcare cu 5-bromdezoxiuridină (după Kihlman și colab., 1978).

Fenomenul de schimb între cromatidele-surori a fost prima dată observat de către Taylor (1958) la *Vicia faba* prin autoradiografie, cu ajutorul căreia s-a demonstrat replicarea semiconservativă a ADN la cromozomii eucariotelor. Tehnica SCE este însă superioară celei autoradiografice care oferă o rezoluție slabă.

În 1972, Zakharov și Egolina au constatat că acele cromatide care au încorporat 5-bromdezoxiuridina în ADN au o morfologie diferită față de cromatidele normale care conțin timină.

În sfîrșit, o reală contribuție la punerea la punct a acestei metode o aduce Latt (1973), prin descoperirea faptului că 5-bromuracilul (5-BU), care înlocuiește timina în ADN cromozomial, reduce puternic fluorescența

colorantului „Hoechst 33258". În acest fel, cromatidele care conțin ADN în care 5-BU nu a substituit timina strălucesc foarte tare; o fluorescență intermediară se observă cînd cromatidele au substituit un singur lanț din ADN, iar cromatidele care au ambele lanțuri substituite strălucesc cel mai slab.

Perry și Wolff (1974) au eliminat dezavantajul pierderii rapide a fluorescenței și deci imposibilitatea examinării lamelor, prin combinarea a două tehnici: fluorescență + Giemsa (FPG). Prin aceasta, colorația cu Giemsa se menține permanent și cromatidele se disting ușor una de alta. Schimburile dintre cele două cromatide pot fi astfel ușor observate, cromozomii avînd un aspect harlechinizat.

Din cercetările efectuate pînă acum cu această metodă s-au constatat următoarele:

— SCE nu pot fi observate decît după trecerea unui ciclu mitotic, între aplicarea BUdR și fixarea materialului, aceasta însemnînd că formarea SCE necesită replicarea ADN și a cromozomilor.

— radiațiile ionizante care produc aberații cromozomiale pe tot parcursul ciclului mitotic, fără să necesite un ciclu de replicare a ADN, produc SCE cu frecvență mică, numărul lor crescînd la doze mari de iradiere (400 r).

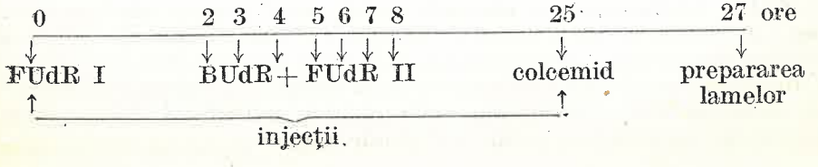
— agenții alkilanți care produc leziuni ale ADN care nu dau naștere la aberații cromozomiale induc un procent mare de SCE la concentrații foarte mici, după ce a trecut un ciclu de replicare a ADN. Deci, aberațiile cromozomiale și SCE par să se producă prin mecanisme diferite: oricum, pentru producerea SCE este neapărat necesară parcurgerea unui ciclu de replicare cromozomială, ceea ce nu este întotdeauna obligatoriu pentru producerea aberațiilor cromozomiale.

Folosirea acestei metode pentru testarea unor substanțe chimice demonstrează dacă substanțele respective acționează asupra replicării ADN, greșelile de replicare fiind evidențiate prin schimburile între cromatidele-surori.

Enumerăm cîteva din avantajele metodei: permite o rezoluție mult mai mare în diferențierea cromatidelor-surori sau a schimburilor dintre ele față de tehnica autoradiografiei; poate concura cu oricare din metodele de bandare; cei doi cromozomi X de la femelă sînt foarte bine diferențiați morfologic, ceea ce nu se poate obține prin bandare; în testul SCE pot fi folosite concentrații foarte mici de substanțe, cu rezultate bune, iar în testarea radiațiilor pot fi folosite doze mari.

Tehnica pentru evidențierea SCE în celulele măduvei osoase și spermatogonii (după Miltenburger, 1979)

Schema de tratament:



1. *Tratamentul* cu 5-fluordezoxiuridină (FUdR), 5-bromdezoxiuridină (BUdR) și colcemid.

Dozele utilizate: FUdR I: 40 mg/kg greutate corporală
soluția: 40 mg în 10 ml soluție de NaCl 0,9%
FUdR II: 2 mg/kg greutate corporală
soluția: 2 mg în 10 ml soluție de NaCl 0,9%
BUdR: 40 mg/kg greutate corporală
soluția: 40 mg în 10 ml soluție de NaCl 0,9%.

După schema de tratament, se injectează cîte 0,1 ml/10 g greutate corporală din soluția de FUdR I (o injecție) și din amestecul BUdR + + FUdR II, la interval de o oră (7 injecții). După 25 de ore, animalele se injectează cu colchicină sau colcemid în concentrația și maniera obișnuită, iar după 27 ore se sacrifică și se realizează lamele.

2. *Prepararea lamelor* se face după metodele convenționale, după care sînt lăsate să se usuce la temperatura camerei 24 de ore.

3. *Colorarea* se face 10 minute cu colorantul fluorescent Hoechst 33258, care se prepară astfel:

— soluție stoc: 5 mg Hoechst 33258 în 100 ml „soluție specială",

— soluție specială: 2,737 g KCl + 8,766 g NaCl în 1 000 ml apă distilată,

— se diluează soluția stoc cu soluția specială, încît soluția finală să aibă 0,5 μg/ml.

Lamele se clătesc de două ori în soluție tampon fosfat pH 6,8, care se prepară înainte de folosire, se acoperă cu 1 cm soluție tampon fosfat, se iradiază cu UV (254 nm), 25 minute, la o distanță de lampă de 25 cm, se introduc în SSC, pentru 90 minute, la 60°C, apoi se usucă la aer, la temperatura camerei, și se colorează cu Giemsa (7%), 8—10 minute (soluția se prepară înainte de folosire). După o clătire ușoară cu apă distilată, lamele sînt lăsate să se usuce la aer și sînt montate în balsam de Canada sau eukitt.

7.1.6. Analiza citogenetică în meioză

Pentru analiza aberațiilor cromozomiale în meioză se folosesc două teste: testul translocațiilor în F_1, care se bazează pe analiza meiozei în generația ce urmează celei tratate, și testul spermatocitic care se bazează pe analiza meiozei direct la animalele tratate. În ambele teste, datorită accesibilității materialului, meioza se studiază la masculi.

Testul translocațiilor în F_1 poate fi efectuat odată cu testul letalelor dominante. Masculii din generația F_1 se sacrifică și se analizează meioza (diachineza — metafaza I) din punctul de vedere al translocațiilor, aberații viabile care se transmit la descendenți.

Testul spermatocitic la masculii tratați constă în analiza spermatocitelor I în diviziune (diachineză — metafaza I) din punctul de vedere al aberațiilor structurale și numerice induse de mutagen. Pot fi observate următoarele tipuri de aberații: translocații reciproce, fuziuni centrice (în cazul cromozomilor acrocentrici), fragmente, univalenți heterozomali și univalenți autozomali, celule poliploide.

Translocațiile reciproce constau în schimbul de segmente terminale între cromozomi neomologi și necesită două rupturi și două reuniri.

Fragmentele cromozomiale sînt aberații instabile, dar se găsesc adesea în spermatocitele în diviziune.

Univalenții autozomali se produc prin asinapsă (absența împerecherii între omologi în zigoten) sau prin desinapsă (separarea omologilor datorită neformării chiasmelor). Astfel de anomalii de obicei nu se produc la animale netratate. *Univalenții heterozomali* se produc cu o frecvență mai ridicată, chiar și la animalele martor, din cauza lipsei de segmente omologe la capetele de asociere a cromozomilor X și Y.

Poliploidia este un fenomen destul de des întîlnit în spermatocitele mamiferelor, chiar și în lipsa unui tratament, iar originea lui este mult discutată, încît depistarea celulelor poliploide se face cu multă precauție și însoțită riguros de probe martor pentru comparație.

În studiul meiozei sub influența unor tratamente este importantă durata unui ciclu complet de spermatogeneză și a diferitelor stadii ce o compun, luate separat. Oakberg (1956), cu ajutorul tehnicii de marcare a celulelor cu adenină ^{14}C și timidină ^{3}H, a stabilit durata unui ciclu complet de spermatogeneză la șoarece (aproximativ o lună de zile) și durata fiecărui stadiu în parte (spermatogonii de tip A și B, spermatocite I și II, spermatide, spermatozoizi). Cunoscînd durata fiecărui stadiu din ciclul spermatogenezei și alegînd intervalele corespunzătoare între tratament și observații pot fi studiate aberațiile cromozomiale produse prin tratament într-un anumit stadiu de dezvoltare a celulei germinative mascule; spermatogoniile sînt celulele germinative mascule cele mai sensibile la agenții mutageni. Dacă în stadiul de spermatogonie a masculilor tratați sînt induse rearanjamente și diferite alte tipuri de aberații cromozomiale, acestea pot fi detectate citologic în stadiul de spermatocit.

Legat de protocolul de aplicare a testului spermatocitic la masculii tratați pot fi date cîteva indicații: numărul de masculi examinați trebuie să fie cuprins între 5 și 10; numărul de celule examinate per mascul tratat de 100; intervalul de timp (zile) între tratament și observații de 50—100.

Procedeele de bază folosite pentru studiul cromozomilor meiotici sînt: tehnica squash (Ohno, Kaplan și Kinosita, 1957; Welshons, Gibson și Scandlyn, 1962; Ford și Hamerton, 1967) și tehnica uscării la aer a lamelor (Evans, Breckon și Ford, 1962; Meredith, 1969), ambele fiind adaptări ale metodelor folosite pentru țesuturi somatice, la material testicular (vezi cap. 3).

Testul spermatocitic la masculii tratați este deosebit de important deoarece translocațiile reciproce pot fi transmise la descendenți prin celulele germinative, deci jumătate din gameții (cei nebalansați) unui animal cu translocație produc mutații letale dominante, iar cealaltă jumătate purtătoare de translocație, dar balansați, produc semisterilitate la descendenți. De asemenea, frecvența translocațiilor induse în spermatogonii este cea reală, deoarece decelarea lor se face în spermatocite, deci înainte ca selecția să poată elimina o parte din translocații. Testul este mai simplu și mai rapid decît cel al letalelor dominante aplicat la spermatogonii. Frecvența translocațiilor spontane este foarte mică.

Dificultatea studierii meiozei la femele constă în faptul că la un moment dat nu poate fi găsit un număr suficient de oocite într-un stadiu

convenabil pentru studiu (diachineză, metafaza I). La șoarece (Edwards și Gates, 1959) și la șobolan (Zarrow și Wilson, 1961) au fost puse la punct metode pentru superovulație. Acestea constau în administrarea de 5—10 U.I. de ser de iapă gestantă, iar 48—56 de ore mai tîrziu administrarea unei doze de ovulație de 5 U.I. de gonadotropină corionică umană. Astfel de metode se folosesc și pentru studiul ovogenezei la om (Ohno și colab., 1962; Kennedy și Donahue, 1969).

7.2. Teste pentru mutageneză utilizate la plantele superioare

7.2.1. Testul aberațiilor cromozomiale

Efectul substanțelor chimice asupra cromozomilor se studiază adesea pe material vegetal (pe vîrfuri de rădăcini), care prezintă o serie de avantaje: sînt ușor de obținut, prin germinarea semințelor, tot timpul anului, ușor de mînuit și ieftine; meristemele conțin un număr mare de celule în diviziune; deoarece celulele vin în contact direct cu substanțele, pot fi studiate efectele unor concentrații cunoscute; unele specii (de ex. *Vicia faba*, *Allium cepa*) au cromozomi mari și în număr mic.

Testul Vicia faba este unul dintre testele mult folosite în depistarea aberațiilor cromozomiale la plante. La această specie, complementul cromozomial ($2n = 12$) constă din 5 perechi de cromozomi subtelocentrici (cromozomi S) și o pereche de cromozomi metacentrici (cromozomi M), aproximativ de două ori mai lungi decît cromozomii S. În general, rupturile produse de substanțele chimice sînt situate în regiunile heterocromatice, care se găsesc de ambele părți ale centromerului în cromozomii M și la jumătatea brațului lung al celor mai mulți dintre cromozomii S. Asupra duratei ciclului mitotic la *V. faba* s-au efectuat foarte multe studii. Astfel, prin metoda autoradiografiei, folosind timidina tritiată ca precursor radioactiv al ADN, Evans și Scott (1964) au găsit că durata ciclului mitotic în rădăcinile primare este de 19,3 ore, din care 17,3 ore interfaza. La rîndul ei, interfaza a fost subdivizată în trei perioade: S = 7,5 ore, $G_1 = 4{,}9$ ore și $G_2 = 4{,}9$ ore în rădăcinile primare.

Pentru obținerea rădăcinilor, semințele se umectează în prealabil 6—12 ore în apă de robinet. Dacă este necesar, sînt desinfectate cu hipoclorit de calciu 5%, 3—10 minute. Germinarea se face cel mai bine în apă de robinet, la 19—20°C. Rădăcinile primare pot fi obținute în 3—4 zile, iar cele laterale în următoarele 3—4 zile, prin tăierea vîrfurilor celor primare.

Testul Allium cepa (Levan, 1938). La această specie, complementul cromozomial ($2n = 16$) constă din 8 perechi de cromozomi, care nu se deosebesc foarte mult între ei ca lungime, la mulți dintre ei brațele fiind aproape egale. Diferența cea mai mare între brațe este pe cromozomul cu satelit. *A. cepa* pare să fie un material citologic mai dificil decît *V. faba*. Totuși, cromozomii de ceapă se colorează mai ușor prin metoda Feulgen și sînt mai sensibili la efectul substanțelor chimice decît cei de bob. De asemenea, bulbii de ceapă prezintă avantajul că pot da numeroase rădăcini, fără a fi necesare condiții speciale de germinare. Durata ciclului mitotic la *A. cepa* este de 20,5 ore la 19°C (Nuti-Ronchi și Arcara, 1967), de 18,8 ore la 20°C (Lopez-Saez, 1966) și de 23 de ore la 21°C (Matagne, 1968).

Deoarece răspunsul la efectul diferitelor substanțe chimice asupra cromozomilor în vîrfurile de rădăcini este foarte variat, în funcție de modul de acțiune și de factorii de mediu, în astfel de experiențe trebuie respectate cîteva principii:

— tipul de aberații cromozomiale depinde de momentul acțiunii substanței testate; sînt substanțe care acționează în interfaza tîrzie sau în mitoză (de ex. cafeina) și substanțe care acționează asupra sintezei ADN (de ex. agenți alkilanți);

— efectul poate depinde și de pH-ul soluției de tratament (în general efectul este mai puternic la pH mai ridicat);

— temperatura în timpul tratamentului influențează efectul de rupere a cromozomilor (a devenit aproape o regulă că efectul crește cu mărirea temperaturii);

— concentrația oxigenului în timpul tratamentului influențează frecvența aberațiilor cromozomiale, micșorarea concentrației de oxigen ducînd la scăderea frecvenței aberațiilor.

Cînd se montează un astfel de experiment trebuie să se țină seama de cîteva indicații practice: soluția de tratament să fie proaspătă, deoarece se știe că soluțiile apoase se degradează repede; concentrația substanței de testat nu depinde numai de solubilitatea ei în apă, ci și de toxicitate și de doza letală, care evident trebuie găsită; durata tratamentului trebuie să fie cît mai scurtă (în general 1—2 ore pentru o durată a ciclului mitotic de aproximativ 24 de ore). Sînt însă substanțe care nu produc nici o aberație în timp scurt și atunci trebuie încercat un tratament de 24 de ore pentru a fi active; atît tratamentul, cît și perioada de refacere după tratament este bine să se facă la întuneric. Temperatura, pH-ul soluției și concentrația de oxigen trebuie menținute constante.

După tratament, rădăcinile sînt transferate în apă de robinet bine aerată; de obicei, perioadele de refacere sînt cuprinse în limita a două cicluri mitotice; aberațiile apar în general în a doua diviziune după tratament; pentru analiza metafazelor, înainte de fixare, rădăcinile se tratează cu o soluție proaspătă de colchicină (0,02%—0,05%), timp de 2—3 ore, la temperatură constantă (20°C).

Fixarea și colorarea rădăcinilor se face după metoda Feulgen descrisă în capitolul 2.

Analiza aberațiilor cromozomiale induse se face în metafază (cînd se poate calcula frecvența aberațiilor și tipurile lor) sau în anafază (cînd se face o primă inspecție pentru a vedea dacă substanța respectivă a produs sau nu aberații).

Aberațiile care apar în metafază sau anafază, imediat după tratament (0—8 ore), sînt considerate a fi induse în mitoză sau în faza G_2, iar substanțele chimice respective se consideră că au efect *neîntîrziat*. Astfel de efecte au cafeina, oxipurinele metilate (Kihlman, 1966) și inhibitori ai sintezei ADN, cum sînt 5-fluordezoxiuridina (Bell și Wolff, 1964), 2-dezoxiadenozina și hidroxiureea (Kihlman, 1966).

Aberațiile cromozomiale care nu apar în primele 8 ore de la începutul tratamentului apar la 24—48 de ore de refacere, cu frecvență maximă,

deoarece pentru formarea lor au nevoie de replicarea ADN, deci de parcurgerea unei perioade de sinteză (S). Acest tip de efect se numeşte *întîrziat* şi se obţine cu ajutorul agenţilor alkilanţi (Evans şi Scott, 1966), al hidrazidei maleice (Scott, 1968) etc.

Cînd activitatea mitotică nu este inhibată, intervalul de timp de la începutul tratamentului pînă în momentul apariţiei aberaţiilor, în anafază sau metafază, poate fi folosit ca un indicator relativ al stadiului afectat. Bineînţeles, o determinare precisă a stadiului mitotic afectat se poate face numai cu ajutorul metodelor de marcare (Kihlman, 1966).

În anafază, golurile („gaps") şi rupturile sînt uşor de distins, de asemenea şi aberaţiile de tip subcromatidic (punţi cu braţe laterale). Mai greu se poate face deosebirea între aberaţiile de tip cromatidic şi cromozomic, dar acestea în anafază sînt găsite sub formă de punţi şi fragmente. Trebuie avut în vedere că aceste punţi rezultate din schimbări structurale pot fi confundate cu punţile rezultate din lipirea („sticky") şi întinderea cromozomilor, fenomen ce poate fi observat după anumite tratamente (Stoian, 1974).

Aberaţiile cromozomiale induse de diferiţi agenţi mutageni în vîrfuri de rădăcini pot fi de tip : subcromatidic, cromatidic şi cromozomial ; această clasificare este făcută după unitatea de rupere implicată în aberaţii.

Aberaţiile de tip subcromatidic se produc în profază şi ruperea are loc la nivelul unei jumătăţi de cromatidă. Fiind induse în profază, nu sînt produse decît de unele substanţe cu efecte neîntîrziate (de ex. cafeina şi diferite alte oxipurine metilate). Alte substanţe, cu acelaşi tip de efect (5-fluordezoxiuridina, 2-dezoxiadenozina şi hidroxiureea) produc numai rupturi şi goluri. Deci, se poate spune că, efectul neîntîrziat, la rîndul său, poate fi de tip *schimb* şi de tip *fragmentare*. La plante, efectele produse de cele mai multe chimicale sînt predominant de tip schimb.

Aberaţiile de tip cromatidic se produc cînd unitatea de rupere este cromatida şi sînt induse în fazele S şi G_2 de către substanţe cu efect întîrziat (agenţi alkilanţi, hidrazida maleică).

Aberaţiile de tip cromozomial sînt induse în G_1, înainte de duplicare, cînd cromozomii sînt unicromatidici. După duplicare, cromozomul apare rupt pe ambele cromatide în acelaşi loc. Astfel de aberaţii sînt produse de radiaţii ionizante şi unele substanţe chimice cum sînt : streptonigrina, 8-etoxicafeina.

Uneori este dificil de făcut deosebirea între goluri şi rupturi (Stoian, 1974 ; Stoian, Raicu şi Gorenflot, 1975) şi între aberaţii de tip cromatidic şi subcromatidic (Evans, 1962). De aceea se recomandă foarte multă prudenţă şi atenţie pentru analiza lor.

Testul Allium modificat (după Fiskesjö, 1981, 1982). Acest test se bazează pe *testul Allium* elaborat de Levan (1938) şi se recomandă pentru testarea de rutină deoarece este ieftin şi uşor de mînuit, consumă puţin timp şi se poate lucra pe diviziuni celulare excelente. De asemenea, se pare că plantele nu sînt lipsite de capacitatea de a activa promutagenii (Vig, 1978 ; Plewa 1978) şi în plus s-a observat o bună corelaţie între aberaţiile cromozomiale induse cu aceeaşi substanţă în meristemele radiculare pe de o parte şi la mamifere (Grant, 1978), pe de altă parte.

Modificarea testului Allium constă în faptul că rădăcinile nu sînt tratate la o anumită lungime, un anumit timp (de obicei două ore) cu soluţia ce urmează a fi testată, ci bulbii sînt expuşi de la începutul experimentului la tratamentul respectiv, rădăcinile fiind obligate să se dezvolte în soluţia de testat. Pentru scopuri imediate de screening se fac observaţii macroscopice după două zile de tratament, apoi analiza citogenetică.

Se procedează în felul următor :

— Se aleg bulbi de *Allium cepa* egali ca mărime, sănătoşi, fără rădăcini sau frunze verzi ; pentru fiecare variantă se folosesc 5—10 bulbi.

— Se îndepărtează frunzele de la suprafaţa bulbilor, se curăţă de rădăcinile uscate şi se spală bine în apă, apoi se plasează în vase cu soluţia de testat ; se folosesc vase de aceeaşi mărime în tot timpul experimentului.

— Soluţiile pentru testat şi apa (în probele martor) sînt schimbate zilnic în primele 3 zile ; după aceea este înlocuită numai cantitatea de lichid evaporată ; soluţiile pentru testat se pregătesc înaintea experimentului, se păstrează la frigider la 4°C în timpul experimentului şi înainte de fiecare schimbare se ţin la temperatura camerei o oră.

— După 2—5 zile de cultivare bulbii se fotografiază pentru evidenţierea ritmului de creştere şi a lungimii rădăcinilor ; cînd rădăcinile ating ţungimea de 1—1,5 cm se recoltează pentru studiu citogenetic.

— Fixarea şi macerarea + hidroliza se realizează într-un amestec de 9 părţi acid acetic glacial 45% şi o parte HCl 1N, la 50°C, 5 minute.

— Preparatele squash se fac într-o picătură de orceină acetică 2%.

— De la fiecare din cei 5 bulbi ai unei serii se foloseşte o rădăcină, se face un preparat, iar pe fiecare preparat se analizează 100 de metafaze ; se calculează în acelaşi timp indicele mitotic.

— Tipurile de aberaţii cromozomiale urmărite sînt aceleaşi ca pentru orice analiză citogenetică în mitoză.

7.2.2. Testul schimburilor între cromatidele-surori (SCE)

În ultimii ani, efectul unor mutageni chimici a fost testat şi pentru capacitatea lor de a produce SCE în meristemele rădăcinilor. Această nouă tehnică a fost aplicată la *Vicia faba* (Kihlman şi Kronborg, 1975) ca o modificare a tehnicii „Fluorescenţă plus Giemsa" (FPG) folosită la animale (Perry şi Wolff, 1974). La plante au fost obţinute rezultate semnificative şi în directă corelaţie cu cele obţinute la mamifere. Astfel, substanţele testate care au produs o frecvenţă mare de SCE la *V. faba* sînt cele a căror acţiune este dependentă de sinteza ADN (hidrazida maleică, agenţi alkilanţi). În schimb, bleomicina, un antibiotic antitumoral izolat dintr-o linie mutantă de *Streptomyces verticillus*, produce o frecvenţă mare de aberaţii cromozomiale independent de sinteza ADN, dar foarte puţine schimburi între cromatidele-surori. Razele X, ca şi bleomicina, produc aberaţii independent de replicarea ADN şi a cromozomilor, dar au un efect scăzut asupra frecvenţei SCE, chiar la doze mari. Există şi o excepţie de la această regulă şi anume, razele UV cu lungime de undă mare măresc frecvenţa SCE, dar în acelaşi timp produc şi aberaţii cromozomiale independent de replicarea ADN şi a cromozomilor (Kihlman şi colab., 1978).

În concluzie, capacitatea unui agent mutagen de a mări frecvenţa schimburilor între cromatide-surori poate constitui un indiciu că acţiunea

acestuia este dependentă de sinteza ADN și replicarea cromozomială, dar aceasta nu înseamnă că agentul nu poate produce perturbări cromozomiale și independent de sinteza ADN.

Procedeul pentru inducerea de SCE în vîrfuri de rădăcini laterale (Kihlman și Kronborg, 1975; Kihlman și Natarajan, 1978) este următorul:

— Vîrfurile de rădăcini laterale de *V. faba* var. *minor* sînt tratate 16 ore (un ciclu de replicare ADN) cu o soluție apoasă care conține 100 μM bromdezoxiuridină (BUdR), 0,1 μM 5-fluordezoxiuridină (FUdR) și 5 μM uridină (Urd).

— În următoarele 19—23 ore (al doilea ciclu de replicare), rădăcinile cresc în prezența unei soluții apoase de timidină (100 μM timidină și 5μM uridină) sau unei soluții de BUdR. În primul ciclu, cromatidele vor avea constituția TT și TB, iar în al doilea vor fi TB și BB (vezi testul SCE la animale). Înainte de fixare rădăcinile sînt tratate 3 ore cu 0,05% colchicină.

5-fluordezoxiuridina se adaugă pentru a obține o bună diferențiere între cromatidele-surori. FUdR, fiind un inhibitor al sintezei *in vivo* a acidului timidilic din ADN, prin adăugarea sa stimulează încorporarea analogului timidinei, BUdR exogen, în ADN cromozomial. Timidina se introduce în mediu în timpul celui de-al doilea ciclu de replicare, deoarece se știe că 5-fluordezoxiuridina are un efect inhibitor al indicelui mitotic, iar timidina contracarează acest efect. În sfîrșit, uridina se introduce pentru a contracara orice efect inhibitor al FUdR asupra sintezei ARN.

Agentul mutagen chimic studiat este introdus în soluția de creștere după primul ciclu de replicare în prezența soluției de BUdR. Timpul de tratament este de regulă 1—2 ore sau poate acoperi 1 sau 2 cicluri celulare, depinzînd de modul de acțiune al agentului mutagen studiat. Tratamentul se face la întuneric, la 20°C.

Pentru analiza schimburilor între cromatidele-surori lamele sînt preparate după cum urmează: după fixarea peste noapte în alcool — acid acetic la 4°C, rădăcinile sînt clătite în tampon 0,01 M acid citric și citrat de sodiu, la pH 4,7; sînt incubate pentru două ore la 27°C într-o soluție de 0,5% pectinază, dizolvată în același tampon; sînt transferate în apă distilată și colorate Feulgen; se fac preparate squash în acid acetic 45%. După îndepărtarea lamelelor prin metoda gheții uscate, lamele sînt trecute succesiv prin băi de alcool absolut, alcool 85%, 70%, 50%, 30% și apă distilată.

Pentru a mări contrastul dintre cromatidele-surori și a reduce colorarea citoplasmei, preparatele se tratează cu o soluție de ribonuclează, în felul următor: peste țesutul de pe lamă se pun 200 μl din soluția de ribonuclează, se acoperă cu o lamelă și se ține într-o cameră umedă la 27°C, timp de o oră. Soluția de ribonuclează se prepară astfel: 1 mg ribonuclează-A din pancreas de bovine (sigma) se dizolvă în 10 ml 0,5 × SSC (0,075 M NaCl + 0,0075 M citrat de sodiu). Tratamentul cu ribonuclează nu este absolut necesar.

Preparatele sînt clătite în 0,5 × SSC și colorate, 20 minute, cu o soluție Höechst 33258 care se prepară astfel: 1 mg compus fluorocromic se dizolvă în 1 ml alcool etilic; din această soluție se ia 0,1 ml și se adaugă la 200 ml 0,5 × SSC. Preparatele astfel colorate sînt montate în 0,5 × SSC. Observarea la microscopul cu fluorescență, pentru o primă triere, necesită aplicarea unei lamele și înconjurarea ei cu soluție de lipit cauciuc.

După ce se îndepărtează soluția de lipit cauciuc și lamelele, lamele sînt expuse timp de 15 minute la o sursă de iradiere UV, la o distanță de 6 cm de sursă (două lămpi Philips cu lumină fluorescentă 40—W TL09). Lamele sînt păstrate o zi în condițiile de lumină și temperatură din laborator și încă 3 zile la 4°C, la întuneric. După păstrare, lamele sînt incubate 30 minute la 65°C sau 60 minute la 55°C în 0,5 × SSC.

Înainte de colorare, lamele sînt clătite bine în tampon fosfat 0,017 M, pH 6,8; colorarea se face timp de 6 minute în 3% Giemsa dizolvată în același tampon. După colorare, preparatele sînt clătite în tampon fosfat, apoi în apă distilată, uscate la aer și montate în eukitt sau balsam de Canada.

Cîteva recomandări pentru decelarea și analiza SCE la microscop: se analizează numai cromozomii în care cromatidele sînt bine diferențiate, în celule intacte, cu complemente cromozomiale complete; la fiecare tratament se analizează minimum 25 de celule pentru a stabili frecvența SCE.

Analiza schimburilor între cromatidele-surori este ușoară atît timp cît frecvența lor nu este prea mare. La martor pot fi găsite pînă la 20 SCE/celulă; în cazul unor tratamente cu mutageni, frecvența lor se mărește și trebuie analizate cu mare grijă. Deja de la 80 SCE/celulă nu se mai poate face decît o estimare globală a frecvenței lor.

Întotdeauna în aplicarea unui test de mutageneză se pune problema eficienței sale din punctul de vedere al timpului consumat, costului, ușurinței de mînuire, dar mai ales al extrapolării rezultatelor la organismul uman. În cazul folosirii meristemelor radiculare, corelația se poate face numai între aberațiile induse în acestea și în culturi de celule animale, deși există unele deosebiri privind tipurile de efecte (Kihlman, 1966).

8 Metode pentru inducerea poliploidiei la plante și animale. Determinarea gradului de ploidie

8.1. Metode pentru inducerea poliploidiei la plante

Răspîndirea mare a poliploidiei în natură a determinat selecționarea și introducerea în cultură a numeroase specii. Dintre cele tetraploide amintim : cartoful (*Solanum tuberosum*), lucerna (*Medicago sativa*), alunele de pămînt (*Arachis hypogea*), arborele de cafea (*Coffea arabica*), iar dintre cele triploide care formează fructe comestibile, fără semințe și de calitate superioară : bananierul (*Musa sapientium*), ananasul (*Ananas sativus*), vița de vie (*Vitis vinifera*) etc. ; la plop au apărut forme triploide care se caracterizează printr-o creștere luxuriantă și rapidă.

Datorită faptului că plantele poliploide posedă caractere și însușiri valoroase, în ultima vreme au fost create numeroase soiuri și linii la diferite specii : secară, trifoi, plante ornamentale, legume, pomi fructiferi etc. Prin încrucișarea formelor autotetraploide cu cele diploide s-au obținut triploizi la castraveți, sfeclă de zahăr, pepene verde, introduși deja în cultură cu rezultate superioare formelor diploide. De exemplu, întreaga suprafață afectată sfeclei de zahăr este cultivată cu forme poliploide. Printre caracteristicile superioare pe care le prezintă plantele poliploide, comparativ cu cele diploide, amintim : greutatea mai mare a semințelor ; capacitatea de înfrățire ridicată ; calități superioare de panificație la cereale ; producția sporită de masă verde, rădăcini, fructe, zahăr, substanțe proteice, vitamine la sfecla de zahăr, la pepenele verde și la plantele furajere. Plantele ornamentale poliploide prezintă flori mai mari, mai intens colorate și cu o putere de păstrare mai mare. Toate plantele poliploide au rezistență mai mare la ger, secetă, boli și dăunători și o perioadă de vegetație prelungită.

Însușirile biologice și economice superioare au impulsionat și cercetările de elaborare a unor metode eficiente pentru inducerea poliploizilor, din care vom prezenta pe cele a căror aplicare a dus la obținerea unor rezultate pozitive. Aceste cercetări au arătat că există anumite tipuri biologice la care se obțin rezultate superioare și anume :

— plantele care prezintă în mod natural un număr relativ redus de cromozomi în celulele somatice ;

— plantele alogame pot fi mai ușor poliploidizate decît cele autogame, datorită gradului mai mare al heterozigoției ;

— plantele cultivate pentru organele lor vegetative (rădăcini, tulpini, frunze, flori) dau rezultate mai bune prin poliploidizare decît cele cultivate pentru semințe.

Studiile întreprinse pentru obținerea poliploizilor au arătat că plantele cu același număr de cromozomi reacționează diferit la poliploidizare. De exemplu, la inul de ulei, poliploidia este corelată cu creșterea înălțimii plantelor, în timp ce la inul de fuior această creștere este neînsemnată sau lipsește ; în schimb, crește greutatea semințelor, fenomen ce nu se întîlnește la inul de ulei. Această reacție diferită se datorește faptului că la inul de ulei ce provine din Orientul Mijlociu, datorită selecției naturale și artificiale, nu s-au acumulat gene pentru tulpini mai lungi, iar la inul de fuior, chiar la nivelul diploidiei, s-au acumulat genele favorabile lungimii tulpinii, iar dublarea numărului de cromozomi prin poliploidizare are o influență redusă asupra lungimii tulpinilor. Aceeași influență se observă și în cazul dimensiunii semințelor. Ca rezultat al selecției, plantele originare din Orient și-au menținut genele favorabile, în timp ce la cele din nord ele nu s-au acumulat. Reacția la poliploidie este inversă în cazul relației înălțimea plantei — greutatea seminței. Reacții diferite la poliploidie se întîlnesc și la alte specii : *Ribes nigrum*, *Lycopersicum aesculentum* etc.

În transformarea plantelor sălbatice în plante cultivate, o etapă hotărîtoare o reprezintă creșterea volumului celulei, indiferent dacă este determinată de o genă ori de dublarea numărului de cromozomi. Schwanitz (1957) presupune că poliploizii naturali provin din forme primitive cu o structură celulară care nu a atins un volum optim, în timp ce majoritatea poliploizilor obținuți experimental derivă de la forme care deja au atins un volum optim al celulei, influențînd nefavorabil fertilitatea plantelor. Spre exemplu, *L. pimpinellifolium* și *L. racemiflorum*, specii tetraploide sălbatice, formează fructe mari cu multe semințe, în timp ce tetraploidul artificial de *L. aesculentum* prezintă un înalt grad de sterilitate (Quadt, 1949). Din aceste considerente se apreciază că, formele sălbatice și cele recent introduse în cultură constituie un material mai potrivit pentru inducerea artificială a poliploidiei decît formele vechi, cultivate, la care fenomenul de gigantism a atins deja expresia maximă.

Pentru obținerea poliploizilor la plantele agricole, horticole, forestiere etc. se folosesc tehnici variate care pot fi grupate după tipul agenților utilizați în : metode biologice, fizice și chimice.

8.1.1. Metode biologice

Metoda regenerării, elaborată de Winkler (1916) și Joergensen (1928), este una dintre cele mai simple metode de obținere a poliploizilor. Prin tăierea ramurilor se formează un calus, iar din mugurii care se formează din acesta un anumit procent sînt poliploizi (fig. 28). Cu ajutorul acestei metode, Winkler a obținut plante poliploide de tomate, Joergensen (1928) la *Solanum*, iar Greenleaf (1938) la *Nicotiana*. Lindstrom și Koos (1931) au constatat că din calusul format după decapitarea plantelor haploide de tomate adesea apar lăstari diploizi și chiar tetraploizi. În anumite cazuri se poate obține o proporție mai ridicată de ramuri poliploide dacă se aplică pe calusul respectiv hormoni de creștere.

Deşi a dat rezultate pozitive, metoda nu poate fi folosită decît la unele specii de plante care formează un calus bogat.

Metoda infestării cu insecte parazite a vîrfurilor de creştere ale plantelor se bazează pe observaţia că în unele ţesuturi, cum sînt galele, se află numeroase celule poliploide. Pentru obţinerea poliploizilor, vîrfurile de creştere sînt supuse acţiunii unor insecte parazite care prin înţepăturile lor provoacă apariţia galelor.

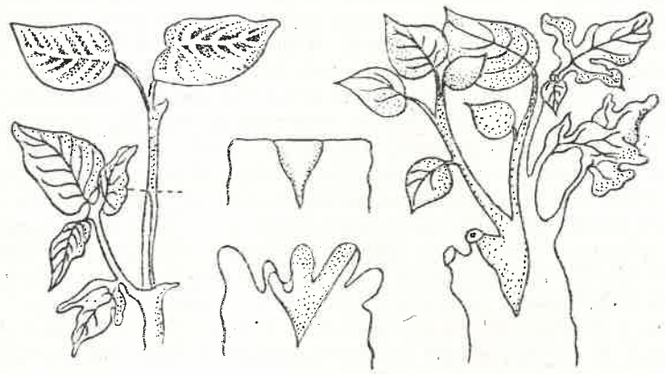


Fig. 28. — Metoda regenerării la genul *Solanum*.

Această metodă nu este larg răspîndită din cauza randamentului scăzut şi a dificultăţilor de aplicare.

Metoda poliembrioniei se bazează pe observaţia că la plantele superioare există un procent redus de seminţe care conţin doi sau mai mulţi embrioni, unii poliploizi, în special triploizi. Müntzing (1957) a constatat că la graminee 0,007—0,15% din seminţe prezintă fenomenul de poliembrionie, din care aproximativ 5% au avut un număr diferit de cromozomi.

Metoda culturii de celule şi ţesuturi vegetale s-a aplicat în ultimii ani pentru obţinerea plantelor poliploide la specii de *Lotus*, *Nicotiana*, *Asparagus*, *Petunia*, *Datura*, *Saccharum* etc. (vezi cap. 9).

Deşi pînă în prezent prin această tehnică s-a reuşit să se obţină poliploizi la puţine specii (*Nicotiana*, *Asparagus*, *Saccharum*) se consideră că are perspective mari de generalizare.

8 1 2 Metode fizice

Metoda centrifugării, elaborată de Kostoff (1937), constă în centrifugarea plantelor cu o viteză suficient de mare pentru distrugerea fusului de diviziune din celulele meristematice, împiedicînd astfel migrarea cromozomilor la cei doi poli ai celulei şi formarea de celule poliploide.

Metoda iradierii vizează distrugerea fusului de diviziune, fapt ce împiedică migrarea cromozomilor şi determină formarea nucleului de restituţie cu un număr dublu de garnituri de cromozomi.

Metoda şocurilor de temperatură, elaborată de Randolph (1932), se bazează pe influenţa temperaturii ridicate de scurtă durată asupra primelor mitoze după fecundare. Metoda a fost aplicată pentru prima dată de Randolph la *Zea mays*, punînd plantele, după polenizare, la 43—45°C, timp de 20 de ore. În acest fel, fecundarea şi primele diviziuni mitotice au avut loc la această temperatură. Din plantele rezultate, circa 5% erau tetraploide. Metoda şocurilor termice s-a folosit la *Triticum aestivum*, *T. compactum*, *Secale cereale* şi la hibrizii *Triticum* × *Secale*. Circa 3% din plantele rezultate s-au dovedit a fi tetraploide. Freisleben (1938) a obţinut prin această metodă 5% plante poliploide la *Hordeum vulgare*.

8.1.3. Metode chimice

Au dat rezultatele cele mai bune în inducerea poliploidiei la plante prin testarea seminţelor sau a plantelor, în diferite faze de vegetaţie, cu o gamă variată de substanţe chimice. Simonet şi Guinochet (1939) împart substanţele chimice după tipul lor de acţiune în două mari grupe şi anume :

— Substanţe cu o acţiune de tipul paradiclorbenzenului care tulbură procesul formării membranei nucleare, dar nu blochează mitozele, astfel că apar celule cu 2, 3 şi 4 nuclei ce prin fuzionare pot forma celule poliploide. Pe lîngă acestea mai citäm : monoclorbenzenul, ortodiclorbenzenul, metadiclorbenzenul, monobrombenzenul, ortoclortoluenul, metaclortoluenul etc.

— Substanţe cu o acţiune de tipul colchicinei care distruge sau inhibă formarea fusului de diviziune. Astfel, cromozomii metafazici nu pot migra spre poli şi sînt incluşi în aceeaşi membrană nucleară. Din acest grup de substanţe fac parte, pe lîngă colchicină, acenaftenul, α-monobromonaftalena, α-monoiodonaftalena, feniluretanul, iodacetamida, aminopterina, mercurul organic, sărurile de cadmiu etc.

Metoda colchicinizării. Blakeslee şi Avery (1937) au fost primii care au reuşit să elaboreze diferite tehnici de inducere a poliploidiei prin folosirea soluţiilor de colchicină, un alcaloid extras din bulbii de *Colchicum autumnale*.

Sub influenţa colchicinei în soluţii apoase, diviziunea celulară se modifică, devenind C-mitoză şi C-meioză. Levan (1938) a studiat influenţa colchicinei asupra radicelelor de *Allium cepa*, constatînd că în urma unui tratament de 72 ore au apărut celule cu 256 cromozomi, adică de 16 ori numărul diploid ($2n = 16$). Ulterior, Steinegger şi Levan (1947) au constatat că celulele plantelor sînt de circa 1 000 de ori mai rezistente la acţiunea colchicinei decît cele ale animalelor.

Influenţa colchicinei asupra diviziunii celulare se realizează în trei moduri : este blocată formarea fusului de diviziune şi se formează nucleul de restituţie, fenomen denumit statmocineză ; formarea fusului de diviziune este blocată parţial, fenomen denumit merostatmocineză ; determină o orientare neregulată a fusului de diviziune, fenomen care se numeşte tropocineză.

C-mitoza, după Levan (1938) şi Molé-Bajer (1958)), are următoarele caracteristici : C-profaza decurge aparent normal, însă C-metafaza

sau pseudometafaza are un aspect deosebit (fig. 29). Datorită faptului că nu se formează sau este dezorganizat fusul central, cromozomii nu se pot dispune în placa ecuatorială, ca în metafaza normală și se dispersează neuniform în celulă pe o suprafață sferică sau ovoidă, care corespunde substanței citoplasmatice a fusului (pseudofus). Cromozomii dispersați în celulă sînt mai scurți și mai groși, cromatidele omologe nu sînt alipite, ci depărtate, rămînînd unite prin centromer. Cromozomii au astfel aspec-

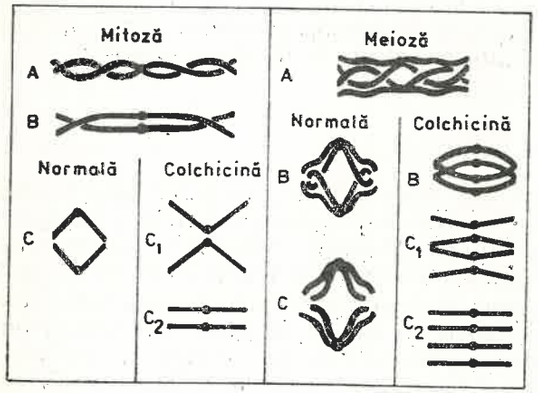


Fig. 29. — Schema diviziunii celulare normale și sub influența colchicinei.

tul caracteristic literei X. Sub acțiunea colchicinei activitatea centromerului este inhibată, iar diviziunea lui este întîrziată cu cîteva ore. În consecință, are loc o prelungire a duratei dintre ruperea membranei nucleare și clivarea centromerilor, aceasta determinînd o acumulare de metafaze în materialul tratat cu colchicină.

C-anafaza sau pseudoanafaza se caracterizează prin clivarea centromerilor și separarea cromatidelor omologe care se dispun paralel, formînd perechi de schiuri. Procesul de clivare al centromerilor la diferiți cromozomi este asincron. Uneori, sub influența colchicinei, clivarea are loc în interfază și, acest caz, pseudoanafaza lipsește, iar celulele în diviziune trec direct la stadiul de C-metafază și C-telofază. Acest proces este mai frecvent la animale, la plante fiind o excepție.

C-telofaza, pseudotelofaza sau statmotelofaza, se caracterizează prin aceea că fiecare pereche omologă de cromozomi este reprezentată de 4 cromatide care devin cromozomi-fii și sînt incluși în aceeași celulă prin formarea unui nucleu de restituție. Acest nucleu are un număr dublu de cromozomi față de celula inițială (nucleu tetraploid). Dacă influența colchicinei se menține, va avea loc o nouă C-mitoză și va rezulta un nucleu octoploid.

C-meioza. Sub influența colchicinei, în desfășurarea diviziunii reducționale se remarcă unele deosebiri față de aspectul caracteristic. Acțiunea se manifestă încă în profază, deranjînd unele fenomene sinaptinemale caracteristice, fapt pentru care cromozomii apar în metafază, în majoritate sub formă de univalenți. În pseudoanafază, cromozomii împrăștiați în întreaga celulă iau forma literei X și după clivarea centromerilor cromatidele omologe formează perechi de schiuri. În pseudo-

telofază, toți cromozomii sînt incluși într-un singur nucleu de restituție, iar celulele cu acest nucleu posedă un număr neredus de cromozomi. Urmează apoi a doua diviziune homeotipică în urma căreia vor rezulta două celule ce vor da naștere la gameți diploizi. Uneori, colchicina acționează în a doua diviziune meiotică, rezultînd doi gameți cu un număr neredus de cromozomi.

Colchicina determină în unele cazuri aberații cromozomiale, în special rupturi (Duma, 1972).

Din cauza toxicității reduse și a efectului său puternic asupra diviziunii celulare, colchicina este folosită pe scară largă pentru inducerea poliploidiei la plante și pentru blocarea celulelor în metafază la animale.

Metodele de colchicinizare la plante, pentru obținerea de autopoliploizi, variază în funcție de specie, organele tratate, momentul cînd se efectuează tratamentul, concentrația soluției etc. În general se folosesc soluții în concentrație ce variază între 0,05 și 1 %, iar procentul de plante poliploide depinde de proporția celulelor care se află în diviziune în perioada tratamentului. Tratamentul se realizează prin imersionarea semințelor negerminate sau germinate, prin pipetarea vîrfurilor de creștere ale plantulelor sau prin introducerea vîrfului de creștere sau a inflorescenței în soluția de colchicină. Concentrația și timpul se stabilesc pentru fiecare specie. Plantulele colchicinizate se notează cu C_0, iar generațiile următoare cu C_1, C_2, C_3 ... C_n.

La animale, rezultatele sînt mult mai slabe comparativ cu cele de la plante. S-au obținut poliploizi la *Bombyx mori*, *Ameoba* sp. etc., prin imersia ouălelor în soluție de colchicină sau prin injectarea de colchicină în ouă.

Pentru ca tratamentul cu colchicină să fie eficient se recomandă ca înainte de efectuarea tratamentului să se stabilească durata ciclului mitotic, iar tratamentul să se efectueze în perioada în care frecvența celulelor în diviziune este maximă. Cei mai mulți cercetători recomandă ca tratamentul să fie efectuat dimineața între orele 7 și 8,30 sau seara între orele 20 și 21, apreciindu-se că în aceste intervale frecvența celulelor în diviziune este mai mare, iar intensitatea evaporării mai redusă, colchicina menținîndu-se un timp mai îndelungat pe plantule (în cazul în care tratamentul se efectuează prin pipetare).

Materialul biologic supus tratamentului reacționează diferit la acțiunea colchicinei. O parte din plantulele tratate pier, o altă parte reacționează parțial, devenind mixoploide, iar un număr relativ redus devin tetraploide. Cercetările privind inducerea poliploidiei trebuie efectuate în prezența unor plante-martor, pentru a urmări efectele tratamentului, iar prin studiul comparativ să fie izolate plantele puternic modificate din care vor fi selecționate, pe baza studiului citologic, plantele poliploide. După tratament este necesar ca plantele să fie plasate în condiții de mediu cît mai favorabile în scopul reducerii tulburărilor provocate de colchicină. La plantele colchicinizate se impune îndepărtarea lăstarilor care provin din mugurii dorminzi diploizi care cresc mai repede decît lăstarii tetraploizi.

Dintre metodele de tratament cu colchicină pentru obținerea formelor poliploide la principalele plante de cultură cîteva prezintă interes în ceea ce privește ameliorarea.

Secale cereale ($2n = 14$). *Metoda Bremer-Reinders şi Bremer* (1954). Seminţele germinate au fost imersionate într-o soluţie de colchicină 0,2 %, 2 ore, sau 0,1 %, 3 ore. Din 270 de plante, care au supravieţuit tratamentului, 114 erau tetraploide, iar 53 mixoploide. La plantele mixoploide, o parte din fraţi erau diploizi, altă parte tetraploizi; uneori, în acelaşi spic, se găseau atît flori diploide, cît şi tetraploide. Florile tetraploide, în special lăstarii tetraploizi pot fi identificaţi şi folosiţi pentru obţinerea liniilor poliploide.

Metoda Elliott (1958). Seminţele sînt puse la germinat pe hîrtie de filtru sau în ghivece cu nisip. După germinare, cînd coleoptilele au 0,5—1 cm, acestea se scufundă într-o soluţie de colchicină 0,25 %, 30 minute (radicelele sînt orientate în sus, fiind introduse prin orificiile unui carton (plastic) care se sprijină pe marginile vasului cu colchicină). Pentru a împiedica uscarea radicelelor, acestea se acoperă cu vată îmbibată cu apă sau cu hîrtie de filtru umedă.

Metoda Bradgö (1955). Boabele de secară sînt imersionate în apă, 24 de ore, după care sînt transferate în colchicină 0,1 %, 48 de ore, sau 0,2 %, 24 de ore. Boabele care au început să germineze se imersionează numai pe jumătate în colchicină, evitînd atingerea coleoptilului şi a radicelei, pentru a împiedica necrozarea lor.

Mihăilescu şi Raicu (1969) au obţinut prin imersionarea în soluţie de colchicină 0,1 %, 3 ore, a 1 400 seminţe germinate, 6 plante tetraploide şi 2 plante mixoploide.

Hordeum vulgare ($2n = 14$). Boabele de orz se pun la germinat pe hîrtie de filtru în vase Petri. După germinare, cînd coleoptilele au 1—3 mm, se imersionează în soluţie de colchicină 0,1—0,3 %, un timp ce variază de la 30 minute la 48 de ore.

Raicu şi Mihăilescu (1969) au constatat că din 400 de seminţe germinate cu soluţie de colchicină 0,1—0,2 % şi 0,4 %, 15 şi 45 minute, 24 şi 48 de ore, 156 au supravieţuit tratamentului, iar dintre acestea 12 erau tetraploide şi mixoploide, prezentînd pe aceeaşi tufă fraţi diploizi şi tetraploizi. Această metodă se poate folosi şi pentru obţinerea poliploizilor la *H. distichum*.

Oryza sativa ($2n = 24$). Boabele de orez se pun la germinat pe hîrtie de filtru în vase Petri, avînd asigurate condiţiile de temperatură, umiditate şi lumină cerute de agrotehnica acestei plante. După germinare, seminţele se imersionează în soluţie de colchicină 0,2 %, 6—12 ore.

Metoda Jacobs (după Nyst, 1959). Boabele de orez se pun la germinat pe hîrtie de filtru în vase Petri închise, în condiţii de umiditate 90 %, temperatură 27°C şi lumină artificială de 10 000 lucşi. După circa 4 zile, cînd germinaţia este totală, plantulele se introduc în soluţie de colchicină 0,2 %, 6 ore. După tratament, plantulele se spală bine în apă distilată, se lasă în apă 5—6 ore în vase Petri, iar cele care supravieţuiesc se transplantează în ghivece amplasate în seră sau în răsadniţe.

Metoda Loung (după Nyst, 1959). Boabele de orez se pun la germinat şi cînd coleoptilele ating 2—5 mm lungime se secţionează longitudinal, pînă la bază, cu o lamă de ras. În secţiune se introduce un mic tampon de vată sau o bucată de hîrtie de filtru îmbibată cu soluţie de colchicină 0,05—0,1 % şi se lasă 24 de ore. Tratamentul se repetă 2—3 zile. În timpul tratamentului, plantulele se păstrează în vase Petri închise, într-o

atmosferă umedă pentru a evita evaporarea colchicinei. După tratament, plantulele se spală şi se transplantează.

Zea mays ($2n = 20$). Primele încercări de obţinere experimentală a poliploizilor la porumb au fost efectuate de Randolph (1932) prin metoda şocurilor de temperatură. Se izolează inflorescenţele femele şi masculeşi, după efectuarea polenizării, plantele se ţin la 43—45°C, 24 de ore. Temperatura ridicată acţionează asupra primelor diviziuni mitotice, determinînd apariţia plantelor poliploide.

Medicago sativa ($2n = 32$). Seminţele se pun la germinat pe hîrtie de filtru. După germinare, plantele se introduc cu vîrful de creştere în soluţia de colchicină 0,2 %, 1—2 ore. Se recomandă să se evite scufundarea radicelelor pentru a nu se necroza. După transplantarea în cîmp se continuă tratamentul încă două zile, prin pipetarea unei picături de colchicină pe vîrful de creştere (Evans, 1955).

Trifolium sp. Pentru obţinerea formelor tetraploide de trifoi se folosesc soluţii apoase de colchicină în diferite concentraţii 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 %.

Metoda Brewbaker (1952). Seminţele se pun la germinat pe hîrtie de filtru în vase Petri. După 4—15 zile, pe măsură ce se dezvoltă plantulele, se efectuează tratamentul cu colchicină. Plantulele se plasează la lumină artificială, iar pe vîrful de creştere se pune cîte o picătură de colchicină 0,1—0,3 % la fiecare 3 ore, timp de 18—24 de ore. După tratament, plantulele sînt spălate şi se trec din nou în alte vase Petri pe hîrtie de filtru îmbibată cu apă, pentru 3—5 zile, după care se transplantează în ghivece sau lădiţe.

Metoda Bragdö (1955) foloseşte vîrful de creştere al plantulelor, pe care se pune o picătură de colchicină cu adaos de agar-agar. Tratamentul se repetă de 3—4 ori la interval de 2 zile. Soluţia se prepară astfel:

— soluţie apoasă de colchicină 2 % . . . . . 2 părţi
— soluţie apoasă de agar-agar 3 % . . . . . 1 parte

Înainte de efectuarea tratamentului, soluţia se încălzeşte pentru a deveni fluidă. Cele mai bune rezultate au fost obţinute prin tratarea seminţelor după cum reiese din tabelul nr. 28.

Tabelul nr. 28

Rezultatele tratamentului cu colchicină la *Trifolium* sp.

Varianta	Seminţe	Plantule
Numărul de indivizi trataţi	434	432
Numărul de indivizi care au supravieţuit	90	391
Numărul de tetraploizi obţinuţi	53	26
Procentul de tetraploizi din numărul de plante tratate	12,2	6,0
Procentul de tetraploizi din numărul de plante care au supravieţuit	58,9	6,6

În Laboratorul de genetică de la Universitatea din Bucureşti s-au experimentat mai multe tehnici folosindu-se soluţii de colchicină 0,1—0,3 %.

După germinare, plantulele sînt scufundate cu vîrful de creştere în soluţia de colchicină, 1—3 ore. Se recomandă să se evite scufundarea rădăcinilor în colchicină care, fiind mai sensibile, se necrozează. Pentru a evita uscarea rădăcinilor, se acoperă cu o hîrtie de filtru sau vată îmbibată cu apă.

De asemenea, se pot trata seminţele care, imediat după germinare se imersionează în soluţie de colchicină, evitînd scufundarea radicelelor.

O altă tehnică constă în tratarea vîrfurilor de creştere prin depunerea unei picături de colchicină 0,2 %, de trei ori pe zi, timp de 3 zile, sau 0,1 %, timp de 6 zile.

Pamfil (1969) a folosit pentru obţinerea formelor poliploide de trifoi soluţii apoase de colchicină de 0,1—0,3 %. Rezultatele cele mai bune s-au obţinut prin tratarea seminţelor îmbibate în apă, 24 de ore, care apoi au fost supuse infiltraţiei prin vacuum, de trei ori, în 5 minute.

Lolium perenne ($2n = 14$). Seminţele germinate sau negerminate se imersionează în soluţie apoasă de colchicină 0,2 %, timp de 3 ore. Tratamentul se efectuează la 25°C (Anloowalia, 1966).

Raphanus sativus ($2n = 18$). Se tratează plante în fază cotiledonară, prin pipetarea pe vîrful de creştere a unei picături de soluţie de colchicină 1 %, timp de 3 zile, de două ori pe zi. Pentru a împiedica evaporarea, în soluţia de colchicină se adaugă agar-agar 0,3 % (Raicu şi Popescu, 1969).

Capsicum annuum ($2n = 24$). Se tratează vîrful de creştere cu soluţie apoasă de colchicină 0,5—0,9 %. Prin acest procedeu, din 70 de plante tratate au rezultat 2 plante autotetraploide (Raicu şi colab., 1965).

Spinacea oleracea ($2n = 12$). Seminţele se păstrează în apă timp de 24 de ore. După îmbibarea cu apă, seminţele se imersionează într-o soluţie de colchicină 0,1 %, pentru 48 de ore, sau 0,2 %, 24 de ore. Se recomandă să se lucreze cu atenţie pentru a nu fi atinse radicelele, care se pot necroza (Bragdö, 1955).

Lactuca sativa ($2n = 18$). Seminţele se imersionează în apă 24 de ore, după care sînt transferate în soluţie de colchicină 0,05—0,1 %, pentru 24 de ore (Bragdö, 1955).

Citrullus vulgaris ($2n = 22$). Plantulele tetraploide se obţin prin tratarea cu soluţie apoasă de colchicină 0,2—0,4 % a unor plante tinere diploide, în stare cotiledonară. Seminţele diploide se seamănă în ghivece nutritive, iar pe vîrful de creştere se aplică o picătură de colchicină, timp de 4—6 zile; se recomandă ca tratamentul să se efectueze între orele 7,30 şi 8,30 (Anghèl, 1975).

În producţie se folosesc hibrizi triploizi obţinuţi prin hibridare între plantele autotetraploide ca genitor matern ($2n = 44$) cu cele diploide ca genitor patern ($2n = 22$). Din această încrucişare rezultă fructe cu seminţe hibride, din care se dezvoltă plante triploide ($3n = 33$) care formează fructe lipsite complet sau aproape complet de seminţe. Pentru obţinerea unor fructe triploide de calitate superioară şi fără seminţe, o importanţă deosebită o are stabilirea acelor combinaţii $4n♀ \times 2n♂$ care transmit principala caracteristică, lipsa seminţelor împreună cu calitatea superioară a fructelor. Sămînţa hibridă triploidă ($3n = 33$) se poate obţine prin polenizarea liberă a plantelor $4n$ cu polen de la plantele $2n$ şi determinarea gradului de ploidie prin folosirea metodelor indirecte sau prin determinarea numărului de cromozomi în celulele ţesutului meristematic al rădăcinilor embrionare (fig. 30).

Polenizarea artificială pentru obţinerea seminţelor triploide fiind un procedeu greoi, s-a pus problema găsirii unor metode practice de identificare pe plantele autotetraploide a fructelor triploide sau folosirea unor gene marker care să permită identificarea fructelor sau a plantulelor în faza de răsad. S-a experimentat cu α-β-diclorobutilat de sodiu, care împiedică înflorirea bobocilor masculi, determinînd sterilitate masculă.

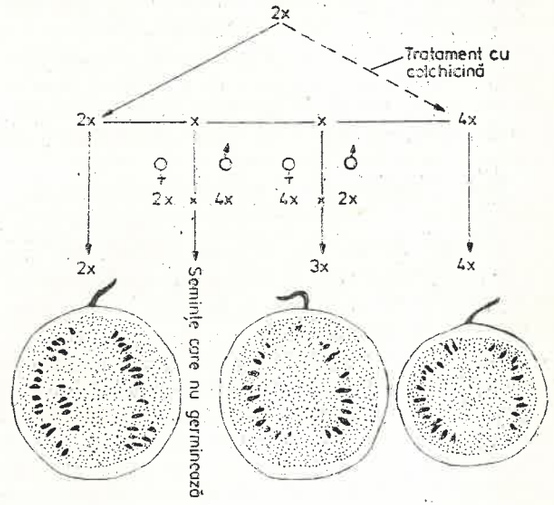


Fig. 30. — Schema producerii triploizilor (după Kihara, 1951).

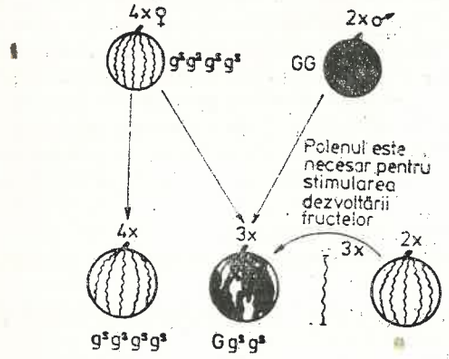


Fig. 31. — Schema identificării pepenilor triploizi, folosind ca genă marker culoarea exocarpului.

Această substanţă însă nu asigură o sterilitate 100 %. Mai utilă este folosirea unei gene marker care controlează culoarea pericarpului fructelor. Cu ajutorul acestei metode, fructele triploide pot fi identificate de cele tetraploide pe baza culorii pericarpului, folosind ca polenizator un soi ce formează fructe de culoare verde închis uniform (genotip *GG*), iar în calitate de plantă-mamă un soi tetraploid cu pericarpul fructelor verde deschis sau dungat (genotip $g^s g^s g^s g^s$). Fructele triploide rezultate din această încrucişare prezintă pericarpul verde deschis cu dungi de culoare închisă (genotip ($Gg^s g^s$)) (fig. 31).

Procedeul cel mai eficient și economic de obținere a triploizilor este cultivarea plantelor autotetraploide și diploide, în același loc, în vederea polenizării libere, în raport de 1♂ : 1♀. Se obțin astfel peste 70 % triploizi. În fiecare zi, seara sau dimineața, înainte de apariția insectelor polenizatoare, se recomandă să se îndepărteze bobocii florilor masculе de la plantele $4n$. În felul acesta, florile femele de la plantele $4n$, în lipsa polenului propriu, vor fi polenizate numai cu polen de la plantele $2n$, și toate fructele legate vor conține semințe triploide.

Pentru obținerea pepenilor fără semințe, plantele $3n$ se cultivă împreună cu cele $2n$ în raport de 4 rînduri plante triploide și 1 rînd plante diploide. Plantele diploide furnizează polenul care favorizează legarea fructelor fără semințe. În lipsa polenului haploid nu are loc formarea fructelor triploide.

Beta vulgaris ($2n = 18$). Pentru obținerea plantelor autotetraploide s-au elaborat mai multe metode de tratament cu colchicină.

Metoda Bremer și Bremer (1954). Se imersionează glomerulele în curs de germinație într-o soluție de colchicină 0,3 %, 3—5 ore. În experiențele efectuate de Margara și Touvin (1958) s-au obținut 12—18 % plante tetraploide și mixoploide.

Metoda Levan (1938). Vîrful inflorescențelor tinere se introduc într-o fiolă de sticlă ce conține soluție de colchicină 2 %, timp de 2 zile. În noile ramuri ale inflorescenței care se formează după tratament apar țesuturi tetraploide și mixoploide, care pot da naștere la ramuri poliploide.

Metoda Savitsky (1954). Se tratează plantulele prin imersionarea vîrfului de creștere în soluție de colchicină. Cele mai bune rezultate s-au obținut prin folosirea concentrației 0,3—0,8 %. Tratînd plantulele în diferite stadii de dezvoltare s-a ajuns la concluzia că procentul plantelor tetraploide crește odată cu descreșterea vîrstei plantelor. Astfel, prin tratarea cu colchicină 0,3 % a plantulelor cu frunze deja apărute dintre cotiledoane au rezultat 2,9 % plante tetraploide; plantulele mai tinere, cu frunze în stadiu rudimentar, au dat 29,4 % tetraploizi; plantulele și mai tinere decît cele precedente au devenit tetraploide în proporție de 40,0 %; prin tratarea semințelor germinate s-au obținut 42,8 % plante poliploide.

Stănescu (1969) a utilizat mai multe metode:

— Semințele germinate sînt imersionate în soluție de colchicină 0,05 %, 6 ore, sau 0,1 %, 4 ore.

— Se tratează vîrful de creștere prin depunerea unui tampon de vată îmbibat cu soluție de colchicină 0,25 %, 20 de zile.

— Se tratează vîrful de creștere cu colchicină 1 %, prin depunerea zilnică a unei picături de colchicină, timp de 9—15 zile.

— Glomerulele se seamănă în ghivece, iar după răsărire se tratează vîrful de creștere prin depunerea unei picături de colchicină 1 %. Tratamentul se repetă după 3 ore și se continuă timp de 8—14 zile, folosindu-se o soluție de colchicină 0,1 %. Procentul de plante poliploide este de 70—80 %.

— Glomerulele se pun la germinat pe hîrtie de filtru, în vase Petri. În momentul în care germenii au radicele de 0,5 cm lungime, se introduc în soluție de colchicină 0,1—0,2 %, 8—12 ore. S-au obținut circa 10 % plante tetraploide.

— Plantulele în stadiu cotiledonar se imersionează în soluție de colchicină 0,3—0,5 %, timp de 6—12 ore, la 25—27°C.

— Se tratează lăstarii florali. Se reține doar 2—3 lăstari viguroși, în momentul în care au 7—8 cm lungime. Pe vîrful de creștere se aplică cîte o picătură de colchicină 0,3 %, timp de cîteva zile. Se poate efectua tratamentul și prin imersionarea lăstarilor într-o soluție de colchicină 0,3 %. Această metodă prezintă avantajul că permite obținerea formelor tetraploide în anul tratamentului.

După cum este cunoscut, în cultură se folosește un amestec de plante autotetraploide și triploide, cele triploide trebuind să depășească 60—80 %. Formele triploide se obțin relativ ușor prin încrucișarea în ambele sensuri a sfeclei tetraploide cu cea diploidă ($4n♀ \times 2n♂$ și $2n♀ \times 4n♂$). Valoarea triploizilor depinde, în afară de caracteristicile liniilor tetraploide, și de cele ale diploidului, care îndeplinește rolul de polenizator. Din această cauză, paralel cu selecția și ameliorarea formelor tetraploide, o importanță deosebită trebuie să se acorde selecției materialului diploid. Cultivînd în amestec plante diploide și tetraploide, în urma încrucișării naturale se obțin populații cu un conținut diferit de forme triploide, tetraploide și diploide. Pentru practică, cel mai indicat s-a dovedit amestecul format din o parte plante diploide și trei părți plante tetraploide, obținîndu-se aproximativ 75 % semințe triploide.

La producerea de semințe trebuie să se țină seama de faptul că producția cea mai mare de semințe hibride triploide se obține cînd diploidul servește ca polenizator și de faptul că polenul unei plante diploide poate fecunda florile a 4—5 plante tetraploide. Pentru a obține o cantitate mare de sămînță hibridă se recomandă plantarea butașilor plantelor tetraploide și diploide, supuse încrucișării în rînduri separate, în proporție de trei rînduri plante tetraploide și un rînd diploide. Datorită capacității de fecundare mai mare a polenului haploid, cel mai mare procent de semințe hibride triploide se obțin pe plantele tetraploide. Din fecundarea liberă a formelor tetraploide și diploide, proporția de plante hibride este de 60—80 % cînd forma tetraploidă este folosită ca genitor matern și de 20—30 % cînd planta-mamă este forma diploidă.

În ultimii ani cercetările sînt orientate în direcția folosirii fenomenului de androsterilitate pentru producerea de sămînță dublu hibridă, combinată cu folosirea poliploidiei și a monogermiei genetice.

Linum usitatissimum ($2n = 30$). Plantulele se imersionează cu vîrful de creștere într-o soluție de colchicină 0,2—0,3 %, 2 ore, sau 0,05 %, 24—48 de ore. Tratamentul se face la temperatura camerei (Bremer și Bremer-Reinders, 1954). La inul de fuior s-au obținut rezultate pozitive și prin tratarea semințelor în timpul germinației sau a vîrfului de creștere în stare cotiledonară cu o soluție de colchicină 0,1 %.

Datura stramonium. ($2n = 24$). Semințele germinate la care embrionul nu depășea 2—3 mm au fost tratate cu soluții de colchicină 0,1—0,4 %, 1—4 zile. După tratament, plantulele se spală cu apă de robinet, se plantează în ghivece, iar cînd ating 15 cm înălțime se transplantează în cîmp. Cele mai bune rezultate s-au obținut prin tratarea semințelor germinate cu soluție de colchicină 0,3 %, 72 de ore (Raicu și colab., 1961).

Antirrhinum majus ($2n = 16$). Se recomandă tratarea plantelor tinere prin depunerea unei picături de colchicină 0,5 % pe vîrful de creștere timp de mai multe zile (Raicu și colab., 1970).

Ageratum mexicanum ($2n = 20$). Prin tratarea a 490 de plantule cu soluție apoasă de colchicină 0,5 și 0,9 %, Raicu și Duma (1967) au obținut 3 plante autotetraploide și 6 plante mixoploide.

Vitis vinifera ($2n = 38$). Dermen (1954) recomandă următoarea tehnică: butașii se plantează în ghivece în așa fel încît la suprafață să rămînă un singur ochi. În momentul în care lăstarul are circa 15 cm lungime se începe tratamentul prin depunerea unei picături de colchicină pe primii 2—3 muguri de la vîrful lăstarului. Ceilalți muguri se îndepărtează. Se folosește o soluție de colchicină 0,5 % la care se adaugă 10 % glicerină pentru a împiedica uscarea rapidă. Tratamentul se repetă de 4—5 ori la fiecare 3 zile. Se recomandă de asemenea să se folosească un tampon de vată care se îmbibă cu o soluție de colchicină care se plasează deasupra mugurilor.

Se poate folosi și o altă tehnică (Lelakis, 1957): se iau butași înrădăcinați și în momentul în care lăstarii au 15—20 cm se păstrează unul singur, cel mai bine dezvoltat, ceilalți fiind îndepărtați. Se taie vîrful lăstarului și se păstrează pentru tratament numai patru muguri de la vîrf, ceilalți îndepărtîndu-se. Cu ajutorul unei foarfece se taie vîrful mugurilor pentru a permite colchicinei să pătrundă în interior.

Tratamentul constă în depunerea pe fiecare mugure a unei picături de soluție de colchicină 0,5 % la care se adaugă glicerină 1 %. Tratamentul se repetă de 3 ori, al doilea se face după două zile de la primul, iar al treilea la trei zile după al doilea, succesiune determinată de timpul de absorbție a colchicinei, primele picături absorbindu-se mai repede. Pentru a forța dezvoltarea mugurilor tratați, la 2—3 zile după ultimul tratament se îndepărtează toate frunzele, ceea ce permite ca mugurii, care în mod normal se dezvoltă în anul următor, să se dezvolte în anul tratamentului. Cu ajutorul acestei metode, Lelakis a reușit să obțină plante tetraploide la 9 din cele 10 soiuri de *V. vinifera* tratate cu colchicină.

Metode pentru obținerea de amfidiploizi, interspecifici și intergenerici, la plante. Se fac întîi încrucișări sexuate, iar semințele hibride (F_0) sau plăntuțele hibride (F_1) se tratează cu soluții de colchicină pentru dublarea numărului de cromozomi în vederea evitării sterilității care se manifestă la plantele hibride în F_1.

Pentru tratarea materialului cu colchicină se pot utiliza aceleași metode care se folosesc pentru obținerea autotetraploizilor. Aceste metode prezintă însă dezavantajul că un număr însemnat de plante pier, din cauza acțiunii toxice a colchicinei. Dacă la inducerea autotetraploidiei nu are mare importanță, în schimb pentru obținerea de amfidiploizi distrugerea unui număr însemnat de semințe sau plăntuțe hibride nu este de dorit, din cauza numărului redus al acestora. De aceea au fost elaborate metode speciale pentru tratarea materialului hibrid care, deși sînt mai greoaie, totuși procentul de pierderi este mai redus, iar dublarea numărului de cromozomi este asigurată.

Metoda Sears (1966). Se desfac tufele plantelor hibride și se replantează în ghivece, pentru a avea un număr mai mare de plante. În momentul în care acestea sînt bine înfrățite, se dezgroapă parțial, se îndepărtează frații unul de altul și pe nodul de înfrățire se pune dimineața și seara un tampon de vată îmbibat cu o soluție apoasă de colchicină 0,5 %, timp de 5 zile. În timpul tratamentului, plantele se plasează într-o atmosferă umedă.

Metoda Bell (1950). Tratamentul se efectuează la înfrățirea plantelor hibride. De la fiecare plantă se taie 1—2 frați. Porțiunea rămasă se introduce într-o fiolă, care conține o soluție apoasă de colchicină 0,3 %; pentru ca soluția să nu curgă din fiolă, aceasta se astupă cu un dop de plută, în care se face un orificiu de aceeași mărime cu a tulpinii, prin care se introduce tulpina secționată; în acest fel colchicina difuzează în fratele respectiv și din el în întreaga plantă. Tratamentul durează 72 de ore. Ca urmare, tulpina supusă acțiunii directe a colchicinei piere, dar în frați are loc dublarea numărului de cromozomi, obținîndu-se amfidiploizi.

Metoda Wellensiek (1947) se folosește pentru inducerea poliploidiei la hibrizii de tip triticale (*Triticum* sp. × *Secale* sp.). Semințele hibride se seamănă primăvara și se multiplică pe cale vegetativă prin despărțirea tufelor. Tratamentul se efectuează în primăvara următoare. Se scot plantele hibride din pămînt, se spală bine, se introduc rădăcinile în soluție de colchicină 0,05 % și se mențin pînă seara, iar peste noapte se transferă în apă. Tratamentul se repetă timp de 4 zile.

Metoda Cauderon (1961). Sămînța hibridă obținută prin încrucișarea între *Triticum* sp. și *Secale* sp. se seamănă toamna în ghivece, care se păstrează în seră rece. În primăvară, plantele se transplantează pe terenul experimental la distanțe mari (30 × 30 cm) pentru a înfrăți abundent. După aproximativ o lună, cînd plantele au circa 10 frați fiecare, se aplică primul tratament. Pentru aceasta se taie 2—3 frați mai bine dezvoltați la 5 cm de la bază. Pe secțiune se fixează un tampon de vată îmbibată cu 10 ml soluție apoasă de colchicină 0,4 %. Pentru a împiedica evaporarea soluției se închide într-un manșon de polietilenă care se fixează la baza plantei cu un elastic. După 48 de ore se îndepărtează tamponul de vată. De regulă, frații tratați mor, însă o parte din cei netratați dau spice cu stamine dehiscente. La aproximativ 3 săptămîni de la înflorire se îndepărtează spicele complet sterile, pentru a menține plantele în stare de vegetație continuă. La o lună după primul tratament se poate aplica al doilea tratament, continuîndu-se astfel atît timp cît continuă să se formeze noi frați.

Pentru obținerea de amfidiploizi, la hibrizii interspecifici și intergenerici de dicotiledonate din F_1, se aplică, în general, aceleași metode de tratament cu colchicină ca și la speciile genitoare. În literatura de specialitate există descrise puține metode specifice pentru inducerea poliploidiei la hibrizii de dicotiledonate. Astfel, Pearson, Hopp și Bohn (1951), lucrînd cu hibrizi interspecifici din genul *Cucurbita*, au folosit următoarea tehnică: semințele hibride se pun la germinat în ghivece la întuneric, pentru alungirea hipocotilului, și apoi se trec la lumină 2—3 zile pentru a avea plăntuțe viguroase. În acest stadiu, ghivecele cu plantule se așază, cu gura în jos, deasupra unui vas cu soluție apoasă de colchicină 0,4 %, astfel că plăntuțele să fie introduse cu vîrful de creștere în soluție, unde rămîn 48 de ore. După tratament, plantulele se spală bine cu apă de mai multe ori.

8.2. Metode indirecte de determinare a gradului de ploidie la plante

Gradul de ploidie se poate stabili cu precizie cu ajutorul metodelor de evidențiere a cromozomilor în celulele meristemului radicular. Deoarece acest studiu poate fi efectuat numai în C_1 și numai în institute în care sînt organizate laboratoare de citogenetică, iar experiențele de inducere a poliploizilor se efectuează cu un număr mare de plante, pentru a ușura activitatea de cercetare se recomandă folosirea unor metode indirecte de determinare a gradului de ploidie. Acestea se bazează pe corelația care există între gradul de poliploidie și diferite caractere anatomomorfologice, microscopice și macroscopice.

După cum se știe, colchicina determină profunde modificări anatomomorfologice și fiziologice ce pot fi evidențiate prin studiul comparativ al plantelor tratate și netratate. Macroscopic se observă ritmul de creștere al plantelor tratate care încetinește și forma, grosimea, culoarea frunzelor și tulpinilor care se schimbă. Pe această bază sînt reținute plantele puternic modificate morfologic și sînt eliminate cele nemodificate. Dintre caracterele microscopice se iau în considerare numărul de cloroplaste în stomate, densitatea stomatelor pe unitatea de suprafață, mărimea (lungimea) stomatelor, mărimea, fertilitatea și numărul de pori germinativi ai polenului.

Metodele indirecte folosite la sfecla de zahăr (Margara și Touvin, 1958; Essad și Touvin, 1959), la vița de vie (Lelakis și Butterfas, 1960) și la ardei gras (Vilmorin și Chopinet, 1952) au fost completate și generalizate la mai multe specii (pepene verde, trifoi roșu, ridichi de lună, secară, orz, gura leului etc.) de către colectivul de genetică al Facultății de biologie din București. În prezent, aceste metode sînt folosite frecvent în acțiunea de obținere a plantelor poliploide și pentru verificarea gradului de poliploidie, deoarece prezintă avantajul de a fi simple, comode, rapide și, important, plantele pot fi folosite chiar în anul tratamentului. În acest fel, pot fi eliminate plantele nemodificate sau cele care au reacționat numai parțial la tratamentul cu colchicină (plante mixoploide) și care se dezvoltă spre diploidie. Experiențele pot continua cu un număr redus de plante, puternic modificate, fapt care ușurează munca de obținere a plantelor poliploide.

Metodele indirecte se pot folosi cu rezultate bune pentru verificarea gradului de poliploidie și în generațiile următoare, în acțiunea de ameliorare a plantelor poliploide și pentru eliminarea eventualelor plante mixoploide sau aneuploide care pot apărea în generațiile următoare. Totodată, se recomandă ca metodele indirecte microscopice să fie folosite pentru identificarea plantelor triploide ce rezultă din încrucișarea $4n \times 2n$ la speciile la care acestea prezintă interes pentru producție (sfeclă, pepene verde etc.).

Caracteristici anatomomorfologice ale plantelor poliploide

Schimbarea raportului nucleu-citoplasmă determină modificări morfologice importante ale întregii plante.

Caractere macroscopice. Frunzele plantelor triploide și tetraploide sînt mai groase și au culoarea verde închis, datorită atît grosimii limbului,

cît și cantității mai mari de clorofilă (23,8 mg la 1 g substanță uscată la linia diploidă de pepene verde Brăila, 32,12 mg la autotetraploidul corespunzător și 31,08 mg la triploidul obținut prin încrucișarea liniilor Brăila $4n$♀ × Arad $2n$♂). Determinările efectuate în perioada anilor 1963—1982 arată o modificare a formei și mărimii limbului frunzei în sensul de micșorare a numărului de lobi și de schimbarea raportului dintre lungimea și lățimea limbului. La majoritatea poliploizilor studiați frunzele sînt mai late, în comparație cu cele ale plantelor $2n$. Dacă lungimea limbului la autotetraploidul Brăila este mai mare cu 21,24 % față de diploidul corespunzător, raportul dintre lungimea și lățimea frunzei este de 0,81 la linia autotetraploidă Brăila și de 1,10 la diploidul respectiv.

Frunzele plantelor poliploide au o suprafață foliară mai mare decît a celor diploide. De exemplu, în cazul soiului de pepene verde Graybelle suprafața frunzei a 10-a a fost de 40,5 cm² la planta diploidă, de 66,7 cm² la plantele triploide și de 65,0 cm² la cele autotetraploide. Datorită măririi suprafeței limbului și a grosimii sale, frunzele plantelor poliploide sînt mai grele decît ale celor diploide; cu toate acestea, greutatea totală a frunzelor unei plante poliploide nu depășește pe cea a unei plante diploide, aceasta datorită faptului că plantele diploide au 331 frunze pe plantă, față de numai 229 la o plantă autotetraploidă a liniei Brăila.

Poliploidia este asociată și cu o perioadă de vegetație mai lungă. Din observațiile efectuate în perioada 1963—1982 s-a constatat că, în general, la sfîrșitul lunii august majoritatea plantelor diploide își încetează vegetația și se usucă, în timp ce, în aceleași condiții pedoclimatice, plantele autotetraploide, în special cele triploide, sînt verzi, înfloresc și leagă fructe chiar în luna octombrie.

Tulpina plantelor poliploide este mai groasă decît a celor diploide. Măsurătorile efectuate la nivelul frunzelor 5, 10, 15 și 20 de la pepenele verde au demonstrat acest lucru. De pildă, la nivelul frunzei a 20-a diametrul tulpinii este de 5,0 mm la forma $2n$, de 7,1 mm la linia autotetraploidă Brăila și de 6,4 mm la triploidul Brăila $4n$ ♀ × Arad $2n$ ♂.

Lungimea tulpinii este mai mică la autotetraploizi și relativ variabilă la triploizi. În același timp, tulpinile plantelor poliploide prezintă un număr redus de ramificații în comparație cu cele diploide.

Pețiolii frunzelor sînt mai groși la plantele poliploide, fiind de 3,8 mm la forma $2n$, de 4,5 mm la autotetraploidul Arad și de 4,0 mm la triploidul Arad $4n$ ♀ × Brăila $2n$ ♂.

Rădăcinile nu suferă întotdeauna modificări prin poliploidizare. Cu toate acestea, la unele plante cultivate pentru rădăcinile lor s-a constatat că mărimea numărului de garnituri de cromozomi este corelată cu o mărire a dimensiunilor și greutății rădăcinilor. După Vilmorin și Chopinet (1952), la soiul de ridiche roșie cu vîrful alb, forma diploidă are greutatea medie a rădăcinilor de 9,2 g, iar forma autotetraploidă 12,9 g. La sfecla de zahăr, formele triploide au o greutate medie mai mare a rădăcinilor.

Floarea are diametrul mai mare la formele autotetraploide și intermediar la cele triploide (fig. 32). Diametrul florilor mascule este de 26,3 mm la soiul diploid Brăila, de 33,6 mm la autotetraploidul corespunzător și de 30,5 mm la hibridul triploid Brăila $4n$ ♀ × Arad $2n$♂.

Fructele plantelor autotetraploide prezintă dimensiuni variabile. La unele specii, cum sînt tomatele, ardeiul, pepenele verde, fructele au di-

mensiuni aproximativ egale la plantele $2n$ și $4n$, iar la altele, cum este *Datura stramonium*, capsulele sînt ceva mai mici, dar mai groase, la plantele autotetraploide. La *Citrullus vulgaris*, în anul colchicinizării și în anii următori, fructele autotetraloide au fost mai mici decît ale celor diploide, reprezentînd 32,6% în C_0 și 96,9% în C_4. La unele soiuri, Brăila

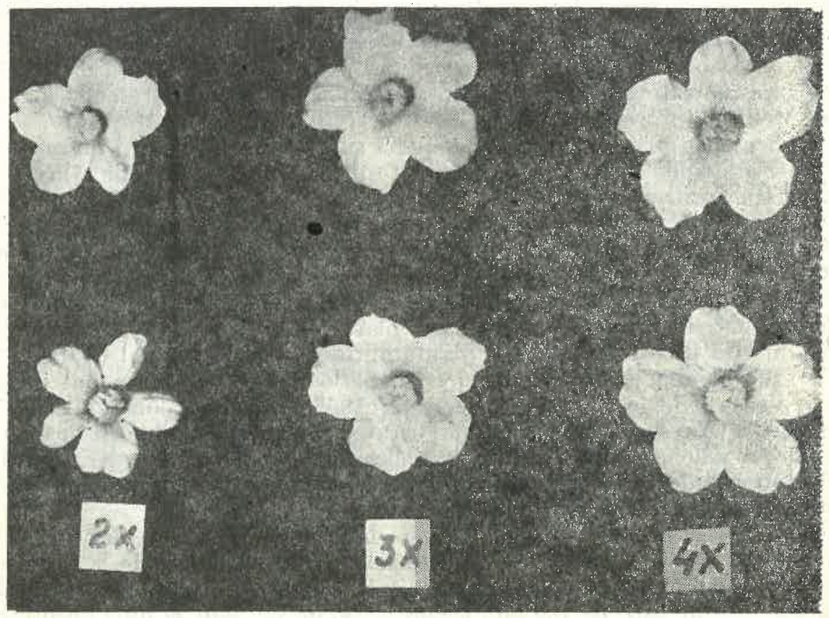


Fig. 32. — Flori de la plante diploide ($2x$), triploide ($3x$) și tetraploide ($4x$) de *Citrullus vulgaris*.

de exemplu, fructele $4n$ depășesc în greutate pe cele $2n$ (Anghel și Ignat, 1974). La plantele autotetraploide se observă adesea o diminuare apreciabilă a numărului de fructe și de semințe. De pildă, *Glycine hispida*, soiul Tokio, numărul de păstăi pe plantă s-a redus de la 64,5 la $2n$, la 24,1 la $4n$, iar cele de semințe de la 109,5 la 27,3 (Vilmorin și Chopinet, 1952). Fructele autotetraploide de *Citrullus vulgaris* conțin un număr mai mic de semințe decît diploizii corespunzători. De exemplu, numărul de semințe per fruct la linia autotetraploidă Arad este de 135,8 față de 1 031,0 în cazul fructelor diploide (Anghel, 1979).

Semințele plantelor autotetraploide sînt în general mai mari decît ale celor diploide. Raicu și colab. (1963) au arătat că în anul 1961 la *Datura stramonium* $2n$ greutatea absolută a semințelor a fost de 6,14 g, iar la 9 linii $4n$ a fost cuprinsă între 8,31 și 15,69 g. În mod similar, la secara diploidă greutatea absolută a variat între 22,85 și 32,0 g, iar la cea tetraploidă între 37,60 și 66,10 g (Raicu și Mihăilescu, 1965).

Caractere microscopice. La plante există o corelație între numărul de garnituri de cromozomi și unele caractere microscopice cum sînt : numărul de cloroplaste în celulele stomatelor, dimensiunea și densitatea stomatelor pe unitatea de suprafață foliară, dimensiunea grăunciorilor de polen, numărul de pori germinativi.

Numărul de cloroplaste în celulele stomatelor. Mochizuki și Sueoka (1955) au arătat că există o corelație directă între numărul de cloroplaste în celulele stomatelor și gradul de poliploidie. Pentru numărarea cloroplastelor se folosește, cu bune rezultate, tehnica colorării cu o soluție de iod în iodură de potasiu *. La speciile la care acestea variază în funcție de vîrstă, mărimea și locul de inserție a frunzei pe plantă, se recomandă să se folosească o porțiune din epiderma inferioară, din aceeași regiune a frunzei la toate variantele diploide, triploide și tetraploide. Numărarea cloroplastelor se poate efectua la frunze proaspete sau conservate. Conservarea materialului se poate face în formaldehidă 4%, alcool etilic — acid acetic (3 : 1) sau soluție de acid picric 1%.

Se aleg plante tinere în faza de 3—4 frunze. Frunzele se recoltează dimineața după circa o oră de la răsăritul soarelui. Pe timp înnorat se recomandă plasarea frunzelor recoltate într-un vas cu apă de robinet, la lumina unui bec electric pentru a intensifica acumularea amidonului. Cu un ac spatulat sau o pensetă se desprinde o porțiune din epiderma inferioară (circa 3—6 mm) și se pune pe o lamă într-o picătură de iod în iodură de potasiu, pentru 2—3 minute. Cloroplastele se colorează în galben-maron. Peste epidermă se plasează o lamelă, iar cu o hîrtie de filtru se îndepărtează excesul de reactiv și se fixează lamela. Preparatul se observă la microscop cu obiectivul 20 sau 40 ×.

Pentru evidențierea cloroplastelor se mai poate folosi o soluție de nitrat de argint 1—2%. Essad și Touvin (1959) au obținut rezultate bune înlocuind soluția de nitrat de argint după 3—4 minute cu o picătură de ulei de parafină care face posibilă menținerea unei colorații satisfăcătoare mai multe zile, cu condiția de a menține preparatele la întuneric.

Pe același preparat se pot efectua mai multe determinări și anume : numărul cloroplastelor în celulele stomatelor, densitatea stomatelor pe unitatea de suprafață foliară și dimensiunea stomatelor. Pentru obținerea unor rezultate concludente este necesară numărarea cloroplastelor din cele două celule ale stomatei, la un număr de cel puțin 25—30 stomate.

Cercetările comparative efectuate în laboratorul de genetică de la Universitatea din București, privind numărul de cloroplaste la forme cu grade variate de ploidie de la 9 specii de plante, a evidențiat faptul că triploizii și tetraploizii au cu 51,5—115,20% mai multe cloroplaste decît diploizii, iar diferențele între medii sînt foarte semnificative. De exemplu, la stomatele soiului diploid de pepene verde Arad se găsesc în medie 14,48 cloroplaste, la autotetraploizii corespunzători 26,1 și la triploizii obținuți prin încrucișarea plantelor autotetraploide din soiul Arad cu diferite soiuri diploide între 21,7 și 23,15.

Analiza curbelor de variație a numărului de cloroplaste în stomate la speciile : *Capsicum annuum*, *Citrullus vulgaris*, *Mathiola annua* și *Trifolium pratense* arată că numai în puține stomate numărul de cloroplaste coincide la formele $2n$ și $4n$. La speciile *Ageratum mexicanum*, *Antirrhinum majus*, *Beta vulgaris* și *Mathiola incana* la formele $2n$, $3n$ și $4n$ în

* Soluția de iod în iodură de potasiu se prepară astfel : într-o soluție de iodură de potasiu (IK 1%) în alcool etilic 80% se dizolvă 1% iod.

care coincide numărul de cloroplaste, stomatele sînt numeroase, astfel că identificarea formelor cu grade variate de ploidie este dificilă, fiind necesară efectuarea unui număr mare de numărători.

Dimensiunea stomatelor. Studiul comparativ al plantelor diploide, triploide și tetraploide a arătat existența unei corelații directe între numărul de garnituri cromozomiale și dimensiunea stomatelor. Pentru determinarea dimensiunii stomatelor se măsoară de obicei lungimea lor, mult mai constantă decît lățimea, care variază cu gradul lor de deschidere. În afara tehnicii de colorare cu iod în iodură de potasiu, se poate folosi și metoda preconizată de Long și Clements (1934), care constă în luarea de amprente cu colodiu de pe fața inferioară a frunzelor. În acest scop, pe fața inferioară a frunzelor se întinde, cu ajutorul unei pensule, o peliculă fină de colodiu care, după ce se usucă, se desprinde cu o pensetă și se examinează la microscop sau cu o lupă binoculară. Pentru examinare, pelicula de colodiu se pune pe o lamă microscopică într-o picătură de apă.

Studiul comparativ al dimensiunii stomatelor de la formele $2n$, $3n$ și $4n$, ce aparțin la 9 specii, a evidențiat faptul că la formele autotetraploide și la hibrizii triploizi, lungimea stomatelor este de 29,2—85,7 ori mai mare decît la cele diploide, diferențele între mediile formelor diploide, triploide sau tetraploide fiind foarte semnificative.

Un alt fenomen foarte evident la poliploizi este amplitudinea de variație mai mare a lungimii stomatelor, comparativ cu plantele diploide. Din această cauză se constată o suprapunere considerabilă a curbelor de variație a dimensiunii stomatelor de la formele $2n$ și $4n$. Ca urmare, pentru a folosi cu succes această metodă, este necesar ca numărul de măsurători să fie suficient de mare pentru ca diferența între mediile respective ale formelor $2n$ și $4n$ să fie foarte semnificative.

Densitatea stomatelor pe unitatea de suprafață. Din cauză că celulele, respectiv stomatele plantelor poliploide sînt mai mari decît ale diploizilor, densitatea stomatelor la formele $3n$ și $4n$ pe unitatea de suprafață foliară este mai mică decît la cele $2n$. Cercetările noastre au arătat că valorile relative ale frecvenței stomatelor la poliploizi nu reprezintă decît 31,5—71,8% din valorile diploizilor (100%). Diferențele dintre mediile calculate matematic sînt foarte semnificative în toate cazurile.

Un alt fenomen foarte evident la poliploizi este amplitudinea mică de variație a frecvenței stomatelor comparativ cu plantele diploide.

Determinarea fertilității și diametrului grăunciorilor de polen se face prin colorarea cu carmin acetic 2%. Polenul fertil se colorează în roșu, în timp ce polenul steril nu se colorează. Fertilitatea se exprimă în procente. Diferențele dintre plantele $2n$ și $4n$ în privința fertilității polenului nu sînt semnificative pentru a folosi acest caracter în scopul identificării poliploizilor.

Măsurătorile efectuate de noi la grăunciorii de polen de la 9 specii au evidențiat o serie de caracteristici. La poliploizi, dimensiunile grăunciorilor sînt mai mari cu 19,3—44,8 μ față de diploizii corespunzători, iar diferențele dintre medii sînt foarte semnificative. De aceea, mărimea grăunciorilor constituie caracterul care deosebește plantele tetraploide și triploide de cele diploide. La plantele diploide, grăunciorii sînt mai mici și relativ uniformi, în timp ce la plantele autotetraploide, în special la

cele triploide sînt neuniformi și cu un diametru ce crește proporțional cu gradul de poliploidie. La plantele triploide, în afara faptului că procentul de polen steril este foarte ridicat și grăunciorii sînt foarte variabili ca dimensiune, grăunciorii care rezultă dintr-o tetradă nu se individualizează, rămînînd adesea grupați.

Determinarea numărului de pori germinativi la grăunciorii de polen se face prin metoda elaborată de Funke (1955) și se bazează pe corelația care există la unele specii între numărul de pori germinativi de la grăunciorii de polen și gradul de poliploidie. Pentru evidențierea porilor se folosește un amestec de acid sulfuric (1 parte) și acid acetic glacial (2 părți). Pentru a se mări contrastul care permite o mai ușoară observare se adaugă cîteva picături de carmin acetic, orceină acetică sau albastru de metil 2—3 %. Sub acțiunea acizilor are loc dizolvarea exinei din dreptul porilor germinativi, permițînd evidențierea acestora sub forma unor excrescențe.

La o serie de specii cum sînt: *Antirrhinum majus*, *Polygonum convolvulus*, *Solanum lycopersicon*, *Trifolium hybridum*, *Tr. incarnatum*, *Ornithopus sativus*, *Medicago lupulina* etc. metoda determinării gradului de poliploidie prin evidențierea porilor germinativi dă rezultate sigure, polenul plantelor poliploide prezentînd un număr mai mare de pori, comparativ cu cele diploide. Astfel, la formele diploide numărul de pori ai unui grăuncior este de 3, în timp ce la formele autotetraploide, în majoritatea cazurilor, sînt 4—6. La speciile alopoliploide, numărul de pori variază în limitele mai mici, fiind 3 la majoritatea grăunciorilor și numai la o parte mai restrînsă 4.

Cercetările lui Funke asupra formelor diploide și tetraploide de la *Secale cereale*, *Festuca pratensis* și *Lolium multiflorum* au arătat că, la aceste specii, grăunciorul de polen are un singur por germinativ, astfel că nu este posibilă utilizarea acestei metode în vederea determinării gradului de poliploidie.

Determinarea gradului de poliploidie prin examinarea cromocentrilor nucleolari se face prin metoda elaborată de Reitberger (1956) pe baza cercetărilor sale întreprinse la *Beta vulgaris*, la care fiecare garnitură de cromozomi are un cromozom cu un satelit heterocromatic. Această regiune heterocromatică formează un cromocentru care are capacitatea de a se colora atît în timpul diviziunii celulare, cît și în interfază. La această specie, gradul de ploidie este corelat cu numărul de cromocentri. În general, cromocentrii se dispun simetric în jurul nucleului, volumul nucleolului fiind proporțional cu numărul de cromocentri (fig. 33).

Pentru evidențierea cromocentrilor nucleolari se recomandă folosirea unor plante în vîrstă de circa două luni. Se recoltează frunze tinere care se fixează în alcool-acid acetic (3 : 1), iar colorarea se efectuează în soluție de carmin acetic. Cu un ac spatulat se recoltează porțiuni mici din epiderma inferioară a frunzei și se pun pe lamă într-o picătură de carmin acetic. Pentru intensificarea colorării se încălzesc preparatele la flacăra unei lămpi cu spirt, evitîndu-se fierberea. Încălzirea la flacără durează 10—15 minute, după care peste epidermă se plasează o lamelă și fără a presa (ca să nu se deformeze celulele) se efectuează observațiile la microscop. Pentru a mări contrastul dintre cromocentri și citoplasmă se reco-

mandă folosirea unui filtru verde şi iluminarea puternică a cîmpului microscopului. La plantele diploide se găsesc 2 cromocentri, 3 la cele triploide şi 4 la cele tetraploide.

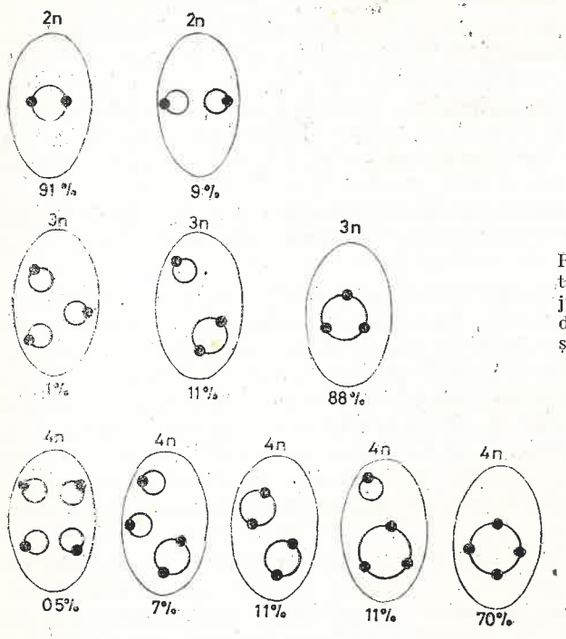


Fig. 33. — Schema repartizării cromocentrilor în jurul nucleolilor la plante de *Beta vulgaris* 2*n*, 3*n* şi 4*n* (după Reitberger, 1965).

8.3. Metode pentru inducerea de poliploizi la ciuperci

Ciuperci sporulate. Formele poliploide la ciupercile sporulate se pot obţine cu ajutorul unor substanţe chimice care acţionează asupra celulelor în diviziune (acenaften, cloroform); colchicina este puţin utilizată pentru obţinerea poliploizilor la ciuperci din cauza acţiunii sale toxice şi pentru faptul că odată cu trecerea timpului ciupercile se adaptează la mediul ce conţine colchicină, iar uneori o folosesc ca element nutritiv. Cu rezultate mai bune se foloseşte acenaftenul cu ajutorul căruia s-au obţinut poliploizi la specii din genurile *Botrytis*, *Graphium*, *Saccharomyces*, *Candida* şi *Torulopsis*.

Tehnica de lucru. Celulele haploide de *S. cerevisiae* se cultivă pe mediu de bere lichid (Ball 5°), la 30°C. După 2—3 zile, suspensia de celule se centrifughează la 3 000 turaţii pe minut, timp de 3 minute. Se îndepărtează supernatantul, iar peste celule se adaugă soluţie de colchicină 0,01—1 %, timp de 1—3 ore. După tratament se îndepărtează colchicina şi se adaugă apă distilată sterilă. Cu ajutorul micromanipulatorului se izolează ascosporii şi se cultivă pe mediu solid, pentru obţinerea unor culturi pure genetic.

Prin această metodă s-au obţinut pe cale experimentală poliploizi la *Saccharomyces cerevisiae*, *S. vini* şi la alga verde *Chlamydomonas* sp.

Tehnica hibridologică (Vecitomov, 1965) constă în hibridarea între tulpini haploide sau cu diferite grade de ploidie şi mutante auxotrofe pentru un anumit aminoacid sau cu deficienţe respiratorii (mutante „petite").

Încrucişările se efectuează pe mediu minimal solid sau lichid. Pentru obţinerea diploizilor se folosesc două tulpini auxotrofe pentru un anumit aminoacid (de exemplu, histidină şi leucină) ce nu pot creşte pe mediu minimal. Hibridările se efectuează pe mediu minimal solid, folosindu-se tehnica replicii. Coloniile ce se dezvoltă pe mediu minimal sînt diploide, funcţiile celor două tulpini fiind complementare.

Pentru obţinerea triploizilor se folosesc mutante „petite" ce se obţin pornind de la hibridul diploid, care se încrucişează cu o tulpină haploidă auxotrofă pentru un aminoacid. Încrucişările se fac în mediu minimal lichid. După 3—4 zile, timp suficient pentru a se realiza hibridarea, se însămînţează celulele pe mediu minimal ce conţine numai 0,1 % glucoză. Coloniile ce se dezvoltă sînt triploide. Verificarea gradului de ploidie se face astfel: din tulpinile genitoare şi din hibridul rezultat se pregătesc suspensii, ce se vor păstra 24 de ore în termostat, la 30°C. Din fiecare suspensie se fac însămînţări pe mediu minimal solid, în vase Petri. În mod normal, celulele ce aparţin genitorilor auxotrofi pentru un anumit aminoacid nu cresc. Celulele hibride formează colonii albe, fiind triploide.

Această tehnică se foloseşte şi pentru obţinerea tetraploizilor, pentaploizilor şi hexaploizilor.

Ciuperci asporulate. La aceste ciuperci, folosite în industria drojdiilor furajere pentru obţinerea formelor poliploide, metoda hibridării nu dă rezultate. Forme poliploide s-au obţinut pentru prima dată prin tratarea celulelor cu camfor la *Torulopsis utilis*. Imshenetsky (1966) a obţinut forme poliploide la *Candida scottii*. Pentru aceasta, celulele de drojdie au fost tratate cu o soluţie de camfor 0,3 %, acenaften 0,2 % şi 1 %, colchicină 0,1 % şi 1 %. Drojdiile au fost cultivate în picătură suspendată, în mediu fiind introdusă una din soluţii. Metoda cultivării în picătură suspendată permite controlul vizual al apariţiei celulelor uriaşe, poliploide, ce pot fi izolate cu ajutorul unei pipete şi transferate pe un mediu solid.

8.4. Metode pentru inducerea poliploidiei la animale

Fenomenul poliploidiei este mai puţin răspîndit în lumea animală faţă de cea vegetală. Printre cauzele care determină raritatea formelor poliploide animale amintim:

— Poliploidia alterează echilibrul nucleu — citoplasmă şi schimbările metabolice celulă — mediu, fapt pentru care organismul animal este puternic perturbat, mai ales în ceea ce priveşte dezvoltarea embrionară.

— Poliploidia produce perturbarea determinismului cromozomial al sexelor. Formarea de organisme intersexuate constituie un obstacol de prim ordin în apariţia poliploizilor animali, în cazul speciilor în care sexul

este determinat de către heterozomi. La speciile inferioare, care au posibilitatea unei reproduceri partenogenetice, fenomenul poliploidiei este frecvent. De exemplu, crustaceul *Artemia salina* prezintă forme diploide care se reproduc sexuat şi forme triploide, tetraploide, pentaploide, octoploide şi decaploide care sînt partenogenetice.

— Poliploidia determină un grad ridicat de sterilitate, fapt care dezavantajează formele poliploide în cursul evoluţiei.

Cu toate aceste dezavantaje au fost elaborate mai multe metode pentru obţinerea artificială a poliploizilor la animale.

Metoda Astaurov (1959) este folosită pentru obţinerea poliploizilor la viermele de mătase (*Bombyx mori* × *B. mandarina*) şi constă în imersionarea ovulelor în apă caldă (46°C), pentru 15—18 minute, ceea ce are ca efect blocarea diviziunii celulare reducţionale şi inducerea dezvoltării partenogenetice. Ca urmare, se dezvoltă organisme diploide şi tetraploide care încrucişate cu formele diploide dau naştere la triploizi. S-a dovedit că formele tetraploide sînt fertile, în timp ce masculii tetraploizi sînt complet sterili. Prin încrucişări (*B. mori* 4*n* ♀ × *B. mandarina* 2*n* ♂) se obţin hibrizi triploizi de ambele sexe. Prin tratarea ovulelor nefecundate s-a obţinut o dezvoltare partenogenetică şi apariţia de forme hexaploide. După reducerea meiotică a oocitelor 6*n* (4*n* *B. mori* + 2*n* *B. mandarina*) au apărut nuclei 3*n* (2*n* *B. mori* + *n* *B. mandarina*). Prin fecundarea ovulelor 3*n* cu spermatozoizi de *B. mandarina* s-au obţinut organisme tetraploide de ambele sexe (2*n* *B. mori* + 2*n* *B. mandarina*).

Metoda Tazima (1965). S-au obţinut poliploizi la viermele de mătase prin tratament cu CO_2 a ouălelor, efectuat timp de 180 minute imediat după depunerea lor de către fluture. Ouăle se introduc în fiole de sticlă peste care se trece un curent de CO_2. În unele cazuri, tratamentul se efectuează la diferite intervale de timp după depunerea ouălelor.

Metoda Fankhauser şi Humphrey (1959) se poate folosi pentru obţinerea de poliploizi la *Triturus viridescens*. Se utilizează şocurile termice reci, imediat după intrarea pronucleului mascul în ovul, deoarece la amfibieni cea de-a doua diviziune meiotică a ovulei nu se termină pînă în momentul intrării pronucleului mascul. Datorită şocului rece, fusul nuclear este distrus, ovulul devine diploid, iar prin fecundarea cu un spermatozoid haploid se formează un embrion triploid. Dacă şocul rece se aplică după ce fecundarea a avut loc, se produce o dezorganizare a fusului acromatic şi în urma primei diviziuni anormale a zigotului apare o celulă 4*n* din care se dezvoltă un embrion tetraploid (fig. 34).

S-au iniţiat *experienţe de obţinere a poliploizilor şi la mamifere*. De regulă însă, embrionii poliploizi pier în primele etape de dezvoltare, încît practic nu este posibilă obţinerea de animale adulte poliploide. Metodele pentru inducerea artificială a poliploidiei se bazează pe posibilitatea fecundării simultane a unei ovule de către doi spermatozoizi (poliandrie) sau prin fecundarea unei ovule nereduse (2*n*) de către un spermatozoid (poligenie).

Fecundarea la mamifere constă în eliminarea corpului polar secundar şi formarea a doi pronuclei care conţin cromozomii materni şi paterni, precum şi unirea celor doi pronuclei în procesul singamiei. Fiecare spermatozoid care pătrunde în ovul este capabil să formeze un pronucleu separat, deoarece apariţia primului pronucleu nu blochează formarea

celorlalte. La ovulaţie, de obicei ovulele elimină primul corp polar şi se află în metafaza celei de-a doua diviziuni meiotice. Dacă între ovulaţie şi fecundaţie se produce o întîrziere mai mare, are loc blocarea polispermiei de către singamie şi prima diviziune a zigotului nu mai are loc. Ca urmare, într-un ovul pot pătrunde doi spermatozoizi care se transformă în doi pronuclei masculi. Fuziunea celor trei pronuclei, doi masculi şi unul femel, în procesul singamiei duce la apariţia unui embrion triploid. Frecvenţa poliandriei la animalele de laborator poate ajunge la 10 %, în cazul unui interval mai mare între ovulaţie şi fecundaţie. La şobolan s-a reuşit majorarea frecvenţei poliandriei la 34 % prin tratarea ovulelor cu şocuri termice calde (42—48°C).

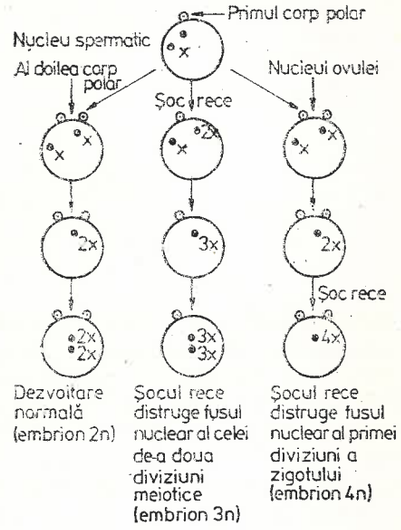


Fig. 34. — Inducerea poliploidiei la amfibieni prin şocuri de temperatură (după Fankhauser şi Humphrey, 1959).

Embrionii triploizi pot apărea ca urmare a nefuncţionării fusului acromatic al celei de-a doua diviziuni meiotice a ovulului. Ca urmare, al doilea corp polar nu este eliminat şi singamia se produce între doi pronuclei femeli şi un pronucleu mascul. Polispermia are loc, de asemenea, cu frecvenţă mare în cazul unei întîrzieri a fecundaţiei, ajungînd la 34 % la hamsterul auriu şi 21 % la iepure şi porc. Se obţin astfel embrioni triploizi, care posedă două garnituri de cromozomi materni şi o garnitură paternă. S-a constatat că tratamentul cu colchicină sau şocurile termice pot bloca funcţionarea fusului nuclear al celei de-a doua diviziuni meiotice a ovulului, astfel că se formează concomitent doi pronuclei. Prin unirea lor cu un pronucleu mascul rezultă un embrion triploid.

Embrioni triploizi se pot obţine şi prin tratarea cu şocuri termice, colchicină etc., care afectează fusul de diviziune la prima diviziune a zigotului. În general se constată că embrionii poliploizi sînt eliminaţi în diferite etape ale gestaţiei şi, ca urmare, nu apar organisme poliploide.

9 Culturi de celule și țesuturi vegetale. Inducerea androgenezei

Metoda de cultură *in vitro* a celulelor și țesuturilor vegetale a fost elaborată independent de Gautheret (1959) și White (1963). Aceste culturi sînt folosite în prezent atît pentru studierea unor probleme fundamentale de fiziologie a plantelor, de biologie celulară și genetică, cît și în cadrul unor vaste programe cu caracter aplicativ în agricultură, silvicultură, horticultură și industrie. Introducerea acestor tehnici a permis acumularea unor cunoștințe legate de totipotența, diferențierea, diviziunea, nutriția, metabolismul și conservarea celulei vegetale. Actualmente este posibilă cultivarea celulelor în cantități mari, obținîndu-se clone pornind de la o singură celulă, iar meristeme, calusuri sau celule izolate pot regenera plante prin androgeneză sau embriogeneză *in vitro* (fig. 35 și 36). A devenit posibilă obținerea unor plante cu grade variate de ploidie prin culturi de țesuturi sau endosperm. La unele specii, prin cultura *in vitro* a embrionilor, după o hibridare sexuată interspecifică, urmată de eliminarea cromozomilor unuia dintre genitori, se pot obține haploizi. În înmulțirea vegetativă a unor plante de mare interes economic se recurge tot mai des la culturi de meristeme, care permit obținerea unor plante libere de virusuri. De asemenea, culturile de embrioni, ovule și ovare, ca și polenizarea *in vitro* sînt folosite în ameliorarea plantelor pentru depășirea barierelor legate de sterilitate și incompatibilitate.

Odată cu introducerea tehnicilor de inducere a androgenezei prin cultura anterelor (Guha și Maheswari, 1964) și a polenului izolat (Nitsch, 1974) a devenit evident că metodele de cultură *in vitro* pot mări considerabil viteza de obținere a haploizilor. Interesul pe care-l prezintă plantele haploide pentru genetică și ameliorarea plantelor nu mai necesită explicații ample. Este suficient să fie amintit doar faptul că aceste organisme cu număr gametic de cromozomi permit detectarea mutațiilor recesive și obținerea de plante homozigote într-o singură generație. Pînă în prezent, prin folosirea tehnicilor menționate, au fost obținuți haploizi la numeroase specii.

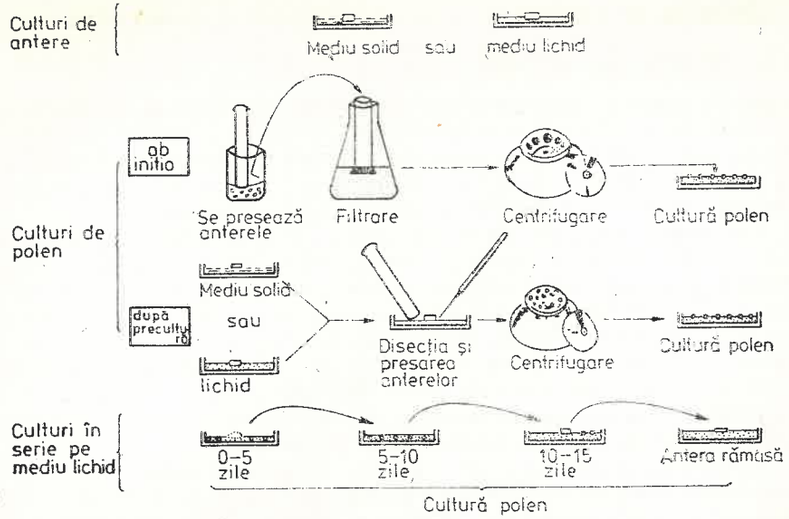


Fig. 35. — Procedee folosite pentru cultura de antere și polen.

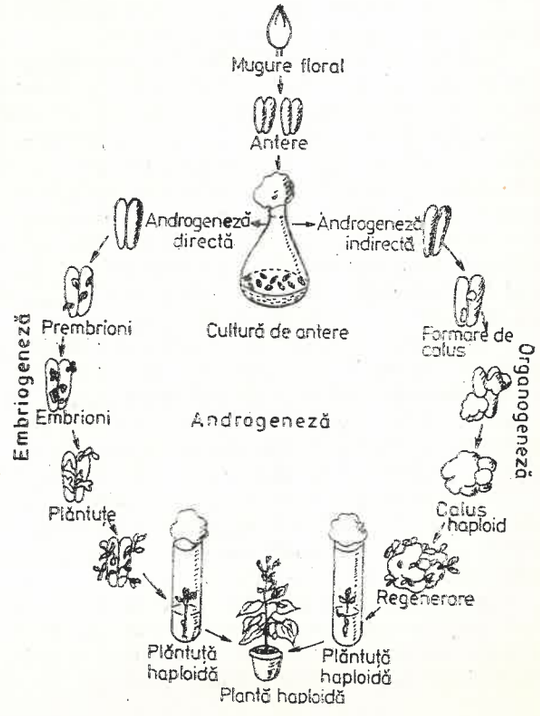


Fig. 36. — Obținerea de plante haploide prin cultura de antere.

9.1. Tehnica de cultură *in vitro* a celulelor și țesuturilor vegetale

9.1.1. Mediul de cultură

Compoziția mediului este un factor important în cultura de țesuturi. Deoarece condițiile de cultură care favorizează creșterea calusului pot diferi de cele care induc diferențierea organelor, fiecare tip de țesut necesită o formulă diferită a mediului, în funcție de obiectiv, pentru a asigura o rată de creștere optimă sau pentru inducerea organogenezei.

Un mediu standard (de bază) constă dintr-un amestec echilibrat de macro- și microelemente (cloruri, azotați, sulfați, fosfați și ioduri de calciu, magneziu, potasiu, azot, mangan și bor), vitamine, o sursă de carbon, factori organici de creștere (aminoacizi, uree și peptone), o sursă de azot redus și fitohormoni. Pentru inducerea mitozei în celule care nu se mai divid sau în cazul unor țesuturi care nu cresc pe medii pure sintetice se pot adăuga: lapte de nucă de cocos deproteinizat, suc de tomate, suc de pepene verde, suc de portocale și alte extracte de plante, extract de drojdie, extract de malț sau hidrolizate proteice.

Mediile Gamborg și colab. (1968), Schenk și Hildebrandt (1972) au fost formulate pentru cultivarea unei game largi de țesuturi de la monocotiledonate și dicotiledonate. Walter și Skoog (1966) au folosit pentru creșterea unor culturi de țesuturi de la *Fraxinus* un mediu sintetic, care constituie de fapt o variantă a mediului Reinert și White (1956).

Treptat au fost diferențiate trei categorii de medii: de inducere a calusului, de creștere și de diferențiere.

În general, creșterea calusului necesită prezența în mediu a glicinei sau a acizilor L-glutamic + L-aspartic și a amidelor acestora, a L-argininei sau a L-tirozinei, a unui amestec de 18 aminoacizi (în cazul mediului Reinert și White (1956) sau a unei combinații complexe de vitamine. Pentru a fi disponibil în condiții de pH ale mediului variabile, fierul se adaugă sub formă de citrat sau, mai bine, chelat de EDTA (etilendiamintetra-acetat de sodiu feric). Se mai folosesc și ingrediente organice speciale: riboflavină, acid folic, colinclorid, acid ascorbic, ciancobalamină și acid p-aminobenzoic. Pentru studii de nutriție și metabolism este folosit agarul bacteriologic (Difco Noble 0,6—1,0 %), iar în lucrări de rutină se poate recurge și la alte tipuri de agar.

Procedeele standard de pregătire a diferitelor medii sînt descrise de Gautheret (1959), White (1963) și Butenko (1968).

Pregătirea mediului de cultură impune folosirea de substanțe pure, dacă este posibil substanțe chimice pentru analiză. Cîntărirea diferitelor ingrediente va fi făcută întotdeauna în fiole de sticlă adecvate (singurele excepții — zaharoza și agarul care pot fi cîntărite pe hîrtie).

În majoritatea cazurilor sînt folosite cîteva medii, preparate cu puțin timp înainte de a fi utilizate. Păstrarea lor timp îndelungat este o practică greșită. Perioada maximă de păstrare după sterilizare este de 14 zile (tabelele nr. 29—31).

Prepararea mediilor de bază poate fi facilitată de folosirea unor soluții-stoc concentrate din amestecuri de săruri anorganice, vitamine și substanțe de creștere stabile în soluție apoasă. Soluțiile de vitamine și de substanțe de creștere trebuie păstrate în vase Pyrex, de dimensiuni

Tabelul nr. 29

Constituenții anorganici majori din diferite medii de cultură (mg/l)

Constituenți	Gautheret (1959)	Hildebrandt și colab. (1946)	Nitsch (1951)	Heller (1953)	Reinert și White (1956)	Murashige și Skoog (1962)	White (1963)	Gamborg și colab. (1968)	Schenk și Hildebrandt (1972)
$(NH_4)_2SO_4$	—	—	—	—	—	—	—	134	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	125	180	250	250	360	370	720	500	400
Na_2SO_4	—	800	—	—	200	—	200	—	—
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	—	—	—	—	—	—	—	—	—
KCl	—	65	1 500	750	65	—	65	—	—
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	—	—	25	75	—	440	—	150	200
$NaNO_3$	—	—	—	600	—	—	—	—	—
KNO_3	125	80	2 000	—	80	1 900	80	3 000	2 500
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	500	400	—	—	200	—	300	—	—
NH_4NO_3	—	—	—	—	—	1 650	—	—	—
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	—	—	—	125	16,5	—	16,5	150	—
$NH_4H_2PO_4$	—	33	250	—	—	—	—	—	300
KH_2PO_4	125	—	—	—	—	170	—	—	—

Tabelul nr. 30

Microelementele din diferite medii (mg/l)

Constituenți	Gautheret (1959)	Hildebrandt și colab. (1946)	Nitsch (1951)	Heller (1953)	Reinert și White (1956)	Murashige și Skoog (1962)	White (1963)	Gamborg și colab. (1968)	Schenk și Hildebrandt (1972)
$NiSO_4$	0,05	—	—	—	—	—	—	—	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	—	—	—	—	—	27,85	—	—	15
Na_2EDTA	—	—	—	—	—	37,25	—	—	20
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	3	4,5	3	0,1	4,5	22,3	7	10	10
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,18	6	0,5	1	1,5	8,6	3	2	1,0
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,05	—	0,025	0,03	—	0,025	—	0,025	0,2
$BeSO_4$	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—
H_2SO_4	1	—	0,5	—	—	—	—	—	—
$Fe_2(SO_4)_3$	50	—	—	—	2,5	—	2,5	—	—
$T_2(SO_4)_3$	0,2	—	—	—	—	—	—	—	—
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	—	—	—	0,03	—	—	—	—	—
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,05	—	—	—	—	0,025	—	0,025	0,1
$AlCl_3$	—	—	—	0,03	—	—	—	—	—
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Tartrat feric	—	40	—	—	—	—	—	—	—
$FeC_6O_5H_7 \cdot 5H_2O$	—	—	10	—	—	—	—	—	—
Fe (ca sechestren)	—	—	—	—	—	—	—	28	—
KI	0,5	3	0,5	0,01	0,75	0,83	0,75	—	1,0
H_3BO_3	0,05	0,38	0,5	1	1,5	6,2	1,5	3	5
$Na_2NaO_4 \cdot 2H_2O$	—	—	0,025	—	—	0,025	—	0,25	0,1

Tabelul nr. 31

Constituenții organici din diferite medii de cultură (mg/l)

Constituenți	Gautheret (1959)	Hildebrandt și colab. (1946)	Nitsch (1951)	Heller (1953)	Reinert și White (1956)	Murashige și Skoog (1962)	White (1963)	Gamborg și colab. (1968)	Schenk și Hildebrandt (1972)
Zaharoză	30	20	50	20	—	30—50	20	20	30
Glucoză	—	—	36	—	—	—	—	—	—
Mio-inozitol	—	—	—	—	100	100	—	100	1 000
Acid nicotinic	0,5	—	—	—	0,5	0,5	0,5	1	0,5
Piridoxină HCl	0,1	—	—	—	0,1	0,5	0,1	—	0,5
Tiamină HCl	0,1—1	0,1	1	1	0,1	0,1	0,1	10	5
Pantotenat de calciu	—	—	—	—	0,1	—	1	—	—
Biotină	—	—	—	—	0,01	—	—	—	—
Glicină	3	3	—	—	—	2	3	—	—
Cisteină HCl	10	—	10	—	3	—	1	—	—

adecvate, la 20°C; soluția-stoc de săruri minerale poate fi păstrată la 2—4°C și trebuie verificată periodic pentru depistarea eventualilor precipitați sau contaminanți biologici vizibili. Extractul de drojdii și hidrolizatul de cazeină nu pot fi păstrate în soluții-stoc și de aceea se adaugă în mediu. Acidul indolacetic este păstrat în soluții-stoc timp de cîteva zile, la întuneric și temperaturi scăzute. Laptele de cocos, ai cărui constituenți activi sînt termostabili, se fierbe pentru deproteinizare, se filtrează, se autoclavează și se păstrează la —20°C. Agarul necesar pentru solidificarea mediului trebuie folosit la un grad înalt de purificare. În general se recurge la concentrații de 0,6—1%. Constituenții radioactivi, mediile radioactive și sticlăria folosită pentru manipularea acestora se păstrează separat sub mențiunea „radioactiv".

Sterilizarea mediului. Tehnica-standard de sterilizare comportă la 15 minute, la 121°C. În cazul sterilizării unei cantități mari de mediu „în bloc" apar două probleme: devine esențială prelungirea acestei etape, pentru ca întreg mediul să atingă temperatura de 121°C, iar pentru împiedicarea fierberii mediului trebuie asigurată o scădere lentă a presiunii. Autoclavarea unor cantități mari de mediu (2,5 sau 10 l) implică menținerea soluției la temperaturi ridicate pentru mai mult timp decît în cazul sterilizării în vase mici de cultură (care conțin 20—100 ml mediu).

Un mediu relativ stabil în condițiile sterilizării în vase mici poate suferi modificări în cazul autoclavării în volume mari. De exemplu, zaharurile, care nu se caramelizează în cazul practicării ciclului normal, relativ scurt de autoclavare, se caramelizează în condițiile sterilizării în volume mari. O serie de substanțe stabile, în cazul autoclavării în soluție apoasă pură pot fi modificate chimic în condițiile prezenței altor constituenți din mediu. Autoclavarea unui constituent separat și adăugarea lui aseptică în mediul care, de asemenea, a fost autoclavat separat permite evitarea sterilizării prin filtrare. Acesta constituie procedeul recomandat pentru testarea carbohidraților ca sursă de carbon.

Un constituent termolabil în soluție poate fi încorporat pe două căi:

— tratarea substanței uscate cu oxid de propilen sau de etilen, înlăturarea eterului la o temperatură sub 30°C și prepararea unei soluții în apă sterilă care se adaugă în mediul autoclavat anterior;

— pregătirea unei soluții care se filtrează prin filtre bacteriologice.

Modul de pregătire a 1 l de mediu Murashige-Skoog. Într-un balon Erlenmeyer de 1 l se pun circa 500 ml apă distilată și se introduce un agitator magnetic. Se adaugă:

— ingrediente: 30 g zaharoză, 100 mg mioinozitol, 0,1 mg tiamină HCl, 0,5 mg piridoxină HCl, 2 mg glicină și 0,5 mg acid nicotinic;

— 20 ml din soluțiile A, B și G;

— 5 ml din soluțiile C, D, E și F;

— soluțiile de hormoni, în concentrațiile impuse de tipul de mediu și tipul de cultură.

Conținutul balonului este adus la 900 ml cu apă distilată și, în regim de agitare continuă, se ajustează pH-ul la 5,8 ± 0,2 cu soluție de NaOH sau KOH 1N. Se scoate agitatorul magnetic, se trece conținutul balonului într-un cilindru gradat și se completează volumul cu apă distilată pînă la 1 l. Se trece din nou într-un balon Erlenmeyer de 2 l, în care se mai adaugă 10 g agar Bacto (tabelul nr. 32).

Tabelul nr. 32

Mediul Murashige și Skoog

Soluții-stoc de săruri minerale

Stoc	Sarea	g/l
A	NH_4NO_3	82,5
B	KNO_3	95
C	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	88
D	KH_2PO_4	34
E	H_3BO_3	1,24
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,05
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,005
	KI	0,166
F	$MnSO_4 \cdot H_2O$	3,38
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	74
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,005
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,725
G	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1,39
	Na_2EDTA	1,865

Concentrația finală a sărurilor minerale în mediu

Sarea	mg/l	μM	Sarea	mg/l	μM
NH_4NO_3	1 650	41,2	H_3BO_3	6,2	100
KNO_3	1 900	18,8	$MnSO_4 \cdot H_2O$	16,9	100
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	3,0	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,63	30
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	1,5	KI	0,83	5
KH_2PO_4	170	1,25	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	1
Na_2EDTA	37,3	0,2	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	0,1	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,1

Compușii organici adăugați la mediu

Sucroză	30	g/l
Glicină	2	mg/l
Acid indolilacetic	1—20	mg/l
Kinetină	0,04—10	mg/l
Mioinozitol	100	mg/l
Acid nicotinic	0,5	mg/l
Piridoxină HCl	0,5	mg/l
Tiamină HCl	0,1	mg/l
Agar	10	g/l

Sterilizarea este realizată într-un autoclav, la 100°C, 25 minute. Folosirea unui balon cu o capacitate de aproape două ori mai mare decît volumul soluției este necesară pentru a se evita pierderea mediului adus la temperatura de fierbere în timpul sterilizării.

După sterilizare, se așteaptă pînă cînd temperatura scade la aproape 90°C, se agită pentru a asigura amestecarea agarului topit în soluție. În cazul folosirii unor substanțe instabile la temperaturi ridicate, concentrația mediului trebuie să fie puțin mai mare decît nivelul menționat. Ulterior, diluarea la nivelul normal se realizează prin adăugarea soluției sterilizate prin filtrare, înainte de solidificarea agarului după autoclavare.

Vase de cultură. Este indicat ca toată sticlăria folosită pentru realizarea culturilor de țesuturi să fie Pyrex sau, eventual, borosilicat. Pentru culturile în mediu lichid se recomandă vase Erlenmeyer de 100, 200, 500 sau 750 ml, care se pot astupa cu dopuri de vată, hidrofobă învelite în tifon fiert în prealabil; cînd culturile sînt realizate la lumină și cînd aerul nu este filtrat este de preferat ca baloanele să fie astupate cu capace. Pentru studii de citodiferențiere, înrădăcinarea lăstarilor obținuți în culturi de țesuturi, pentru culturi de antere sau polen ș.a. pot fi folosite și vase Petri (de 60, 80, 100 mm).

În vederea plasării în fiecare vas a aceleiași cantități de mediu de cultură pot fi folosite aparate automate sau semiautomate.

Sticlăria se spală cu un amestec de acid cromic și acid sulfuric, apoi cu un jet de apă cel puțin 5 minute, după care se face o spălare cu apă distilată sau dublu distilată. În ultimul timp, amestecul oxidant a fost tot mai des înlocuit cu detergenți. Sticlăria curată trebuie protejată de praf, iar dacă nu este folosită imediat după spălare, înainte de repartizarea mediului se va spăla din nou cu apă distilată. Se folosește după uscare și sterilizare la 150°C, timp de o oră.

Înainte de sterilizare, vasele de cultură trebuie închise cu dopuri pentru a evita contaminarea. Dopurile se păstrează în cutii ferite de praf (pot fi folosite de mai multe ori) și trebuie acoperite cu foi de aluminiu, care feresc marginea vasului de praf, protejează dopurile de umezire, prin condensarea în autoclav, și pot fi marcate pentru identificare. Vasele mai pot fi închise cu folie de aluminiu (0,25 mm grosime), care prezintă avantajul că se pot scoate pentru introducerea inoculumului și reașezate. Aplicarea foliilor se face cu o pensă sterilă.

9.1.2. Materialul vegetal

Ca material pentru regenerarea de plante se pot folosi: segmente de tulpini și flori, parenchim cortical, vascular și medular, țesuturi epidermale și subepidermale, porțiuni de țesut cambial (la speciile pomicole), parenchim din tuberculi, petale, rădăcini, vîrfurile lăstarilor, mezofilul frunzelor, cotiledoane, ovule, ovare, endosperm, fragmente de antere. Plantele în vîrstă de 8—10 zile obținute din semințe germinate în condiții aseptice constituie o sursă mai bună pentru inițierea de calusuri, comparativ cu materialul provenit de la plante aparținînd aceleiași specii cultivate însă în cîmp.

Sterilizarea materialului trebuie făcută cu multă atenție, fără a fi vătămate celulele care vor genera țesutul nou. Un agent sterilizant foarte eficace este apa bromurată 1% la care se poate recurge numai pentru sterilizarea semințelor înainte de germinare, dar și atunci în mod judicios, pentru a nu dăuna unor semințe al căror embrion nu este complet protejat (în special la cereale). Soluția de hipoclorit (1% clorină) este frecvent folosită datorită toxicității scăzute. Cu bune rezultate poate fi utilizată și clorura mercurică (0,1%) în soluție apoasă sau alcoolică. Pentru spălare se poate recurge la etanol sau detergent (acesta din urmă eventual încorporat în soluția folosită pentru sterilizare).

Alegerea agentului sterilizant, durata și modul de aplicare a tratamentului se realizează prin testare, deoarece, uneori, un organ prelevat de la o anumită plantă nu poate fi sterilizat, iar alteori același organ, detașat de la o plantă aparținînd aceleiași specii, dar cultivată în condiții diferite, poate fi folosit în realizarea ușoară a unor culturi sterile. Întrucît, țesutul intern, de care depinde procesul de regenerare este steril, procedeul de sterilizare vizează numai țesutul superficial. Nu trebuie omise spălările organului utilizat, înainte și după sterilizare, cînd cu ajutorul apei distilate trebuie îndepărtate toate urmele de agent sterilizant.

Manipulările aseptice. În mod normal, în laborator și în camerele de incubare, repartizarea mediului în recipientele de cultură, trecerea țesuturilor pe medii se fac obligatoriu în condiții aseptice. Acolo unde este posibil, aceste manipulări trebuie realizate în spații special amenajate, chiar camere cu presiune pozitivă și instalații de filtrare a aerului. Aceste spații aseptice pot fi realizate cu ajutorul unor hote cu flux continuu de aer, situate în colțurile unor laboratoare destinate mai multor lucrări, sau pe obișnuitele mese de lucru. În orice caz, întotdeauna în locuri ferite de curent.

Incubarea culturilor de țesuturi pe medii solide, în eprubete sau baloane Erlenmeyer, se face fie într-un incubator bacteriologic, fie într-o cameră cu temperatura controlată; în general, asemenea camere sînt iluminate continuu cu lumină artificială la o anumită intensitate. Incubatoarele bacteriologice cu plafon luminat permit realizarea de culturi atît la întuneric, cît și la lumină.

Există culturi care trebuie ținute la întuneric și atunci sînt protejate în foi de aluminiu sau folii negre, dar numeroase țesuturi cresc bine atît la lumină, cît și la întuneric. Oricum, trebuie testate ambele regimuri, dar deocamdată există prea puține date referitoare la efectul unor intensități luminoase mici asupra creșterii, fapt ce nu permite formularea unor indicații precise privind o intensitate optimă sau o anumită compoziție spectrală.

Studierea efectului luminii asupra creșterii și morfogenezei impune existența unor camere speciale, în măsură să permită controlul intensității și calității luminii, ca și alternarea perioadelor de lumină și întuneric. În orice caz, dacă este necesară înverzirea completă a culturilor trebuie folosite intensități luminoase mari, fapt ce impune folosirea unui incubator sau a unei camere cu temperatură controlată. În asemenea camere, temperatura este menținută în jurul nivelului de 25°C, cu variații de 1°C

(deşi la unele culturi au fost înregistrate creşteri şi la 30°C). Nu trebuie omis faptul că în asemenea incinte este absolut necesar ca circulaţia aerului să se facă într-un regim de viteză redusă.

9.2. Regenerarea de plante în culturi de celule şi ţesuturi

Îmbunătăţirea tehnicii de cultură, ca şi acumularea cunoştinţelor despre factorii care condiţionează citodiferenţierea *in vitro* au permis regenerarea de plante din culturi de celule şi ţesuturi la un număr mare de specii.

În orice program de ameliorare, cultura celulelor şi ţesuturilor se utilizează în următoarele cazuri:

— obţinerea de plante haploide prin androgeneză;
— obţinerea de linii izogene prin diploidizarea haploizilor;
— selecţia unor mutante în culturi de celule la nivel haploid şi diploid;
— obţinerea de plante poliploide;
— transformarea cu ADN exogen la nivelul protoplaştilor;
— hibridarea somatică prin fuziunea protoplaştilor;
— multiplicarea clonală a unor genotipuri valoroase;
— obţinerea de plante libere de viroze.

În fiecare dintre aceste cazuri este necesară regenerarea cel puţin a unei plante, ce va fi ulterior multiplicată *in vitro*.

Regenerarea de plante din culturi de celule şi ţesuturi necesită parcurgerea a două etape: 1) inducerea şi creşterea calusului, 2) citodiferenţierea.

9.2.1. Inducerea şi creşterea calusului

Un ţesut organizat (rădăcină, tulpină) poate fi complet transformat într-o masă nediferenţiată de celule care proliferează activ (numită calus) în condiţiile cultivării pe un mediu nutritiv care conţine hormoni specifici, printre care: acidul indolacetic (AIA), acidul naftilacetic (ANA), acidul indolbutiric (IBA), acidul 2—4-diclorofenoxiacetic (2,4-D), kinetina şi alţi derivaţi purinici. În general, combinarea unei auxine cu o citochinină stimulează inducerea calusului.

Explantul (porţiune de ţesut sau organ folosită pentru iniţierea unei culturi) se cultivă pe medii de cultură-standard şi se incubează în condiţii de temperatură, lumină şi umiditate controlate. Celulele suferă procesul de „dediferenţiere", ţesutul cultivat pierzîndu-şi structura specializată în decursul a 3—4 săptămîni de incubare. Prin subcultivarea pe acelaşi mediu sau pe un mediu cu compoziţie diferită, se ajunge la un calus tipic, liber de influenţa explantului parental, care poate fi menţinut în cultură o perioadă de timp îndelungată prin subculturi repetate, adică prin transferări pe mediu proaspăt la fiecare 4 săptămîni. O cultură de ţesuturi astfel obţinută poate fi crescută şi în mediu lichid, în regim de agitare, ca o cultură de celule în suspensie.

Condiţiile de cultură care favorizează inducerea sau creşterea calusului nu sînt întotdeauna optime şi pentru diferenţiere. Mediul de cultură folosit depinde deci de obiectivul propus: inducerea sau obţinerea unei rate de creştere corespunzătoare sau inducerea diferenţierii. În vederea satisfacerii cerinţelor particulare ale ţesutului cultivat pot fi folosite mai multe variante de medii de cultură, propuse de diferiţi autori.

Calusurile obţinute de la specii diferite se deosebesc prin textură, friabilitate şi culoare. Ele pot fi gălbui, albinotice, clorofiliene sau pigmentate cu antociani.

Caracteristicile unui calus depind de sursa şi originea lui, de ingredientele mediului nutritiv şi de durata subculturii. Celulele calusului sînt extrem de variate ca mărime, formă, conţinut, grosimea peretelui, grad de ploidie. În timpul creşterii, sub influenţa unor stimuli chimici (hormoni), în calus pot avea loc citodiferenţieri sub formă de traheide, elemente liberiene, celule parenchimatice, cambiale şi peridermale. Celule individuale sau grupuri de celule de dimensiuni mai mici pot forma aşa-numiţii „meristemoizi", care constituie centre de proliferare ulterioară sau se transformă în noduli circulari din a căror regiune perivasculară pot diferenţia muguri, rădăcini sau embrioni. Nodulii vasculari se pot forma în regiunea periferică a calusului sau în interior. Natura diferenţierii în ţesut este controlată de concentraţia în hormoni şi factorii nutriţionali. De asemenea, ţesuturile vasculare care diferenţiază pot produce hormoni care, prin interacţiunea cu adaosul exogen de hormoni, induc modificări în reacţia calusului.

Pe măsură ce creşte vîrsta culturilor, celulele somatice cultivate *in vitro* pot suferi schimbări privind materialul genetic. Urmarea este apariţia unor celule poliploide şi aneuploide. Poliploidizarea celulelor diploide se produce prin endoreduplicare sau stimularea selectivă a unor celule deja poliploide existente în calus. În aceste condiţii, o cultură de calus menţinută timp îndelungat prin subcultivări se caracterizează printr-o considerabilă heterogenitate genetică.

9.2.2. Diferenţierea calusului în cultură

O plantă poate fi regenerată din culturi de celule sau calus prin organogeneză (printr-un mugure) sau embriogeneză (printr-un embrion somatic, non-zigotic).

Procesul de citodiferenţiere în calus este indus prin manipularea constituenţilor nutriţionali şi hormonali ai mediului de cultură şi este dependent de o serie de factori ca: originea şi mărimea explantului iniţial, genotipul şi vîrsta acestuia, nivelul hormonilor endogeni, diferiţi factori fizici (temperatură, fotoperioada, intensitatea luminii, pH-ul, concentraţia în zahăr şi chiar calitatea agarului). Datele din literatură nu permit formularea unor indicaţii general valabile privind inducerea citodiferenţierii în calusuri tocmai din cauza factorilor extrem de numeroşi care o condiţionează. Cu toate acestea, pot fi făcute unele recomandări:

— Raportul auxină/citokinină trebuie stabilit cu exactitate, pentru că o creştere a auxinei duce la formarea rădăcinilor, iar o scădere a ei favorizează formarea mugurilor.

— Concentrația absolută a fitohormonilor trebuie atent reglată. De exemplu, în calusul de *Lycopersicon* pentru formarea rădăcinilor sînt necesare 2 mg/l AIA + 2 mg/l kinetină, iar pentru formarea mugurilor 4 mg/l AIA + 4 mg/l kinetină.

— Natura auxinei și a citokininei trebuie adecvată materialului și scopului lucrării. În calusurile de *Asparagus* derivate din protoplaști pot fi formați lăstari pe mediu conținînd o combinație de BA și AIA, dar nu pe un mediu în care sînt prezente zeatina sau 2,4-D.

— Uneori, în mediul de cultură sînt utili și alți hormoni, în afara auxinelor și citokininelor frecvent utilizate. De exemplu, pentru inducerea formării mugurilor se poate recurge la acidul abscisic în locul kinetinei.

— Azotul redus trebuie folosit în mod judicios, întrucît s-a constatat că prezența lui favorizează formarea embrionilor, iar în absența lui se formează rădăcini.

— Repetarea exagerată a subcultivărilor trebuie evitată deoarece se soldează cu creșterea gradului de poliploidie și aneuploidie în celulele calusului și, ca urmare, cu pierderea capacității morfogenetice.

Inducerea de calus și regenerarea de plante la *Nicotiana*

Izolarea și cultura țesutului medular. Sînt folosite tulpini de la plante neinflorite, de aproximativ 1 m înălțime, care se taie la 10 cm deasupra solului astfel încît planta să poată regenera din mugurii de la bază. În acest fel pot exista concomitent atît culturi de țesuturi, cît și planta intactă, legate clonal. Treimea mijlocie a tulpinii este tăiată în segmente de 3—5 cm. Sterilizarea acestor segmente este realizată prin imersie în etanol 70%, 30 secunde, apoi în hipoclorit de sodiu 1%, 10—15 minute. Urmează o spălare cu apă distilată sterilă. Odată extrasă, măduva trebuie tăiată în segmente de 3 mm lungime, care sînt puse în mediu Murashige-Skoog conținînd 11,5 μM AIA și 1 μM kinetină.

Izolarea de calusuri din tulpini mici. Dacă nu sînt disponibile tulpini de dimensiuni mai mari, cu un conținut medular bogat, se utilizează tulpini tinere sau segmente de pețiol. Pentru sterilizare se folosesc procedeele descrise anterior. După sterilizare, țesuturile trebuie spălate cu apă distilată sterilă. Pentru disecție, segmentele pot fi transferate în vase Petri, tot sterile, uscate. Segmentele se secționează longitudinal pe diametru în bucăți de 3—4 mm, care se plasează cu partea plană în jos pe mediul de cultură Murashige-Skoog ce conține 11,5 μM AIA și 1 μM kinetină.

După imersia în etanol, toate operațiunile trebuie să fie efectuate într-o nișă sau o cameră de transfer. De asemenea, trebuie acordată o grijă deosebită sterilizării tuturor instrumentelor, prin imersie în alcool etilic 95% și flambare, după care trebuie să se aștepte suficient timp pentru ca instrumentarul să se răcească înainte de practicarea disecției.

Subcultivarea calusului inițial. La 3—5 săptămîni după izolarea inițială a țesuturilor apar, în mod normal, creșteri considerabile ale explantelor de măduvă. Uneori, noile țesuturi seamănă foarte mult cu o linie de calus obținută în mod normal după mai multe subculturi, alteori, creșterea poate fi redusă, iar calusul friabil, mai ales atunci cînd explantele inițiale au fost constituite din segmente de tulpini mici. În general însă, de pe țesutul inițial pot fi desprinse fragmente de calus de 20—50 mg care,

trecute pe un mediu identic, dau naștere unor linii de calus uniforme. Uneori, după acest transfer calusul nu crește și linia se pierde. În asemenea situații, este necesar ca în mediul de cultură să fie adăugate diferite ingrediente.

Condițiile de creștere. Creșterea calusurilor trebuie realizată la întuneric, în incubatoare biologice, la 26—28°C. Dacă incubatorul este umplut „rezonabil" cu vase Petri, prin evaporare se realizează o umiditate relativă a aerului pînă la 70%. Dacă însă sînt prea puține vase, pe unul din rafturi trebuie plasat un recipient cu apă pentru a se preveni uscarea excesivă a mediului.

Regenerarea plantelor din calus. Cînd se urmărește regenerarea de plante din calus, se recurge la mediul de diferențiere, cu alte concentrații de hormoni.

9.3. Tehnici de obținere a plantelor haploide și a liniilor izogene

9.3.1. Tehnici de cultură a anterelor

Tehnica de excizie și cultură a anterelor este relativ simplă și eficientă. Pentru inducerea androgenezei se recomandă folosirea unor butoni florali închiși ale căror antere conțin microspori uninucleați. După excizie, acești butoni trebuie sterilizați superficial cu o soluție comercială oxidantă (5%) sau cu hipoclorit de calciu 1%, 10 minute. Urmează o spălare în două reprize cu apă distilată. În cazul în care butonii florali au fost recoltați de la plante cultivate în seră, în condițiile în care există siguranța că disecția va fi făcută cu deosebită atenție, se poate renunța la sterilizarea suprafeței.

În continuare, se practică o incizie pe una din fețele butonului floral, iar staminele sînt extrase cu grijă, cu ajutorul unei pense fine într-un vas Petri steril. Cu aceeași grijă sînt îndepărtate apoi filamentele staminale și în fiecare vas de cultură sînt plasate cîte cinci antere. În cursul acestor operațiuni trebuie evitate orice leziuni ale anterelor. Dacă totuși apar asemenea cazuri, anterele lezate trebuie îndepărtate din cultură.

Prelevările trebuie făcute numai de la plante tinere crescute la lumină (Dunwell și Perry, 1973). Plantele bătrîne au și ele butoni de mici dimensiuni, închiși, la care petalele sînt egale cu sepalele, dar ei conțin polen heterogen, ce asigură o rată redusă a androgenezei.

Mediile de bază pentru cultura anterelor sînt prezentate în tabelul nr. 33. Culturile de antere sînt frecvent realizate pe mediu solid conținînd agar, în eprubete sau în mici vase Petri sau într-un mediu lichid, în vase Erlenmayer, în regim de agitare ușoară. Incubarea trebuie făcută la 24—27°C, în condițiile unei fotoperioade de 14 ore, sub o lumină de 2 000 lucși.

În funcție de specie, pentru apariția din antere a plantelor regenerate din polen sînt necesare 3—8 săptămîni. Cînd ating înălțimea de 5 cm, aceste plante se iau de pe mediu, se curăță de agar, prin spălare atentă cu apă, și se transferă în ghivece mici, conținînd sol autoclavat. Pentru reducerea stress-ului și a riscurilor de uscare, plantele trebuie acoperite

cu pahare de sticlă şi plasate într-o atmosferă umedă, în seră; după o săptămînă, paharele pot fi îndepărtate. După încă două săptămîni, cînd plantele au atins dimensiuni corespunzătoare, pot fi transferate în ghivece mai mari, unde pot fi lăsate eventual să înflorească.

Tabelul nr. 33

Compoziţia unor medii de bază folosite pentru cultura anterelor (mg/l)

Elementele	Murashige şi Skoog (1962)	White (1963)	Nitsch (1969)
MACROELEMENTE			
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	—	288	—
KNO_3	1 900	80	950
NH_4NO_3	1 650	—	720
KCl	—	65	—
KH_2PO_4	170	—	68
$NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$	—	19	—
$CaCl_2 2H_2O$	440	—	166
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	737	185
Na_2SO_4	—	200	—
MICROELEMENTE			
$Fe_2(SO_4)_3$	—	2,5	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	—	27,8
Na_2EDTA	37,3	—	37,3
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3	6,7	25
H_3BO_3	6,2	1,5	10
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	8,6	2,2	10
KI	0,83	0,75	—
$Na_2MaO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	—	0,25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	—	0,025
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	—	—
COMPUŞI ORGANICI			
Biotină	—	—	0,05
Glicină	2,0	3,0	2,0
Inozitol	100	—	100
Acid nicotinic	0,5	0,5	5
Piridoxină—HCl	0,5	0,1	0,5
Tiamină—HCl	0,1	0,1	0,5
Acid folic	—	—	5
Zaharoză	30 000	20 000	20 000

9.3.2. Tehnica de izolare şi cultură a microsporilor

Butonii nedeschişi sînt sterilizaţi prin imersie timp de 2 minute în soluţie apoasă de hipoclorit de calciu (7 %) proaspăt preparată, după care sînt spălaţi, în două reprize, în apă distilată.

La speciile care necesită o inducere simplă (cum este *Datura*) anterele sînt disecate numai prin şocuri fizice aplicate butonului, iar polenul este extras imediat după sterilizarea superficială. În schimb, la speciile

care necesită şi o perioadă de inducere în prezenţa unor substanţe chimice, după sterilizare anterele trebuie lăsate să plutească pe un mediu lichid inductiv timp de 2—3 zile. Este cazul cerealelor şi al lui *Nicotiana*. La sfîrşitul perioadei de inducere, cînd prezintă doi nuclei identici, microsporii sînt extraşi din antere.

În cazul unor antere de mari dimensiuni, cum sînt cele de tutun, pînă la 50 de bucăţi sînt plasate într-un pahar de mici dimensiuni, conţinînd 20 ml mediu de bază. Grăunciorii de polen sînt extraşi prin presarea anterelor pe pereţii paharului cu ajutorul unui piston de seringă. Resturile de ţesut sînt îndepărtate prin filtrare. Se recurge frecvent la o sită de nylon, ai cărei pori au diametrul puţin mai mare decît grăunciorii (40 μ pentru *Nicotiana* şi *Datura*, 25 μ pentru tomate, 100 μ pentru porumb).

Suspensiile de polen sînt centrifugate cu viteză mică (500—800 rpm), 5 minute. Supernatantul, conţinînd reziduuri fine, este înlăturat, iar polenul resuspendat în mediu proaspăt şi spălat de două ori. Această spălare este deosebit de importantă mai ales atunci cînd ţesuturile din antere conţin substanţe inhibitoare, care pot stînjeni creşterea microsporilor.

Polenul este amestecat cu un mediu de cultură adecvat, cu densitate de 10^3—10^4 grăunciori/ml. Suspensia finală este pipetată în vase Petri de 5 cm, plasîndu-se cîte 2,5 ml în fiecare vas. Pentru asigurarea unei bune aerări, stratul de lichid din vas trebuie să fie cît mai subţire posibil, vasele sînt lipite cu parafilm, pentru evitarea deshidratării, şi sînt plasate, cîte 14, în vase Petri mai mari de 20 cm. La *Nicotiana*, incubarea este realizată la 27—30°C.

La speciile ai căror butoni florali au dimensiuni mici, cum sînt, de exemplu, cele pomicole şi cerealele, îndepărtarea anterelor este dificilă. În asemenea situaţii, se detaşează de pe ax fiecare inflorescenţă şi fiecare buton de pe receptacul şi se tratează ca şi anterele de *Nicotiana*. O suspensie de polen poate fi, în continuare, preparată folosind fie butoni întregi, fie numai antere.

Microsporii pot creşte foarte bine într-un mediu lichid sau, dacă este necesar, pe un mediu, foarte moale, cu agar (0,6 % agar); în acest din urmă caz, stratul de mediu trebuie să fie foarte subţire.

În anul 1973, Nitsch şi Norreel au obţinut plante din polen izolat de la *Datura innoxia*, cultivată pe un mediu simplu suplimentat cu extract de antere ale aceleiaşi specii realizat în apă caldă. În acelaşi an, Pelletier a regenerat plante din polen de *Nicotiana tabacum* cultivat pe ţesut de *Petunia hybrida*. În continuare au fost puse la punct o serie de metode de diferenţiere a unor plante din polen. Deşi la mai multe specii de *Nicotiana* încercările de regenerare a unor plante din polen au fost încununate de succes, nu se poate vorbi încă de aplicarea unei asemenea tehnici pe scară largă. Totuşi, practicarea culturilor de polen izolat permite evitarea dubiilor inerente în culturile de antere referitoare la originea plantelor regenerate.

Mediile pentru culturile de polen izolat de la tutun sînt variante ale celor utilizate în cazul regenerării de plante din culturi de antere. Pe baza rezultatelor unor analize ale aminoacizilor din ţesuturi de antere-suport pentru embriogeneza polenului Nitsch (1974) recomandă adiţionarea în

mediile folosite pentru culturile de polen a 100 mg/l L-serină, 800 mg/l glutamină şi creşterea conţinutului în mioinozitol de la 5 la 60 mg/l.

Starea fiziologică a plantelor-donor se consideră că este determinantă pentru succesul unor asemenea lucrări. Şansele de reuşită sînt mai mari atunci cînd anterele sînt recoltate la începutul perioadei de înflorire (Sunderland, 1971) şi cresc pînă la 60 % atunci cînd plantele beneficiază timp de 8 ore pe zi de un regim de iluminare intensă (Dunwell şi Perry, 1973).

Selecţia şi pretratamentul anterelor în vederea extracţiei polenului. Se aleg muguri ai căror antere conţin polen care se află, cu foarte puţin timp înainte, în cursul sau imediat după mitoza polenului. Pentru a determina în ce stadiu se găseşte polenul se măsoară lungimea petalelor, între cele două fenomene existînd o strînsă corelaţie; de asemenea, se pot efectua preparate microscopice de antere strivite în acetocarmin.

Nitsch (1974) recomandă menţinerea materialului, timp de 2 zile, la întuneric, într-un mediu umed, la 5°C. Acest tratament este mai puţin eficient în cazul unor plante întregi, antere excizate sau microspori izolaţi.

Cu foarte puţin timp înainte de detaşarea anterelor, mugurii trebuie sterilizaţi la suprafaţă prin imersie, timp de 2 minute, într-o soluţie de hipoclorit de calciu 7 %, urmată de o spălare în cinci reprize în apă distilată. Procedeul implică extragerea celor cinci antere din fiecare mugure în condiţii aseptice şi flotarea acestora pe suprafaţa a 5 ml din mediul de cultură I, în vase Petri cu un diametru de 6 cm. Vasele sînt sigilate cu parafilm, după care urmează o incubare la 25°C sub lumină furnizată timp de 12 ore zilnic de lămpi cro-Lux (500 lucşi). După 4—6 zile polenul poate fi extras din antere.

Tehnicile de extracţie şi cultura polenului. Pentru calcularea numărului grăunciorilor de polen/ml mediu de cultură trebuie ţinut cont de faptul că fiecare anteră de *Nicotiana tabacum* conţine pînă la 40 000 unităţi (Sunderland şi Wicks, 1971).

Actualmente sînt frecvent folosite trei metode de extracţie şi cultură a polenului:

Metoda lui Sunderland şi Roberts (1977). Autorii au pornit de la observaţia că anterele ce plutesc pe mediul lichid, în vase Petri, se desfac imediat după inoculare şi eliberează polen. Pentru inducerea desfacerii precoce a anterelor de tutun este necesară păstrarea mugurilor la 7—8°C, timp de 12 zile. Pentru obţinerea unor rezultate cît mai bune, mugurii vor fi supuşi tratamentului atunci cînd corola are 21—23 mm lungime, imediat după prima mitoză polinică. După acest interval, anterele extrase din cîte trei muguri sînt plasate pe suprafaţa a 5 ml mediu de cultură. La intervale de 6, 10 şi 14 zile, anterele trebuie transferate pe medii proaspete, avînd aceeaşi compoziţie. Incubaţia se realizează la 28°C în vase acoperite, izolate cu parafilm şi în întuneric pe parcursul primelor 14 zile. Transferul are loc la 25°C, în condiţiile unei fotoperioade de 12 ore. Intensitatea luminii: 500 lucşi. Polenul eliberat în mediu după 6, 10 şi 14 zile continuă să crească, formînd embrioni şi eventual plante haploide.

Mediul de cultură II al anterelor (după Sunderland şi Roberts, 1977)

KNO_3	950 mg/l
NH_4NO_3	825
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	185
$CaCl_2$	220
KH_2PO_4	85
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	27,8
Na_2EDTA	37,3
Sucroză	20 000

pH-ul ajustat la 5,5; sterilizare prin autoclavare 15 minute, la 121°C.

— *Metoda lui Nitsch şi colab.* (1974, 1977) comportă dezintegrarea mecanică a anterelor. În acest scop, aproximativ 50 de antere sînt plasate într-un cilindru gradat de 100 ml, conţinînd 20 ml din mediul de cultură I. Pentru zdrobirea anterelor, prin presarea de pereţii cilindrului, se poate folosi pistonul unei seringi de 30 ml. Deşeurile sînt îndepărtate cu ajutorul unei site de nylon (cu ochiuri de 40 μ^2). Filtratul conţinînd polen în suspensie este centrifugat la 100 rpm, timp de 5 minute. În continuare, polenul este spălat de două ori în mediu proaspăt, prin resuspendare şi centrifugare. Urmează diluarea, cu acelaşi mediu de cultură, pînă la densitatea de 10 000 grăunciori de polen/ml. Suspensia finală se pipetează în 2,5 ml soluţie aliquotă, în vase Petri de 5 cm. Izolarea se face cu parafilm, iar incubarea este realizată la 27—28°C, sub o lumină cu intensitatea de 500 lucşi.

În cazurile de aplicare reuşită a acestei tehnici, 5 % dintre grăunciorii de polen diferenţiază formînd plante haploide.

Mediul de cultură I al anterelor (după Nitsch şi colab., 1964)

KNO_3	950 mg/l
NH_4NO_3	725
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	185
$CaCl_2$	166
KH_2PO_4	68
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	27,8
Na_2EDTA	37,3
Glutamină	800
Serină	100
Mio-Inozitol	5 000
Sucroză	20 000

pH-ul ajustat la 5,8; sterilizare prin filtrare

— *Metoda lui Wernicke şi Kohlenbach* (1977) completează într-un fel metoda propusă de Nitsch, încercînd să elimine inhibarea embriogenezei ca urmare a tratamentului brutal aplicat pereţilor anterelor în momentul extracţiei polenului. Ei au plasat anterele pe 5 ml mediu de cultură III, timp de 4,8 şi 15 zile. Pentru anterele ce conţin polen uninucleat este necesară o perioadă de incubare de 16 zile înainte de extracţie. În cazul anterelor în care polenul a terminat prima mitoză este suficientă o perioadă de incubaţie de numai 4 zile. Pentru extracţia polenului se practică incizia cu ajutorul scalpelului. Conţinutul anterelor este scos în mediul de cultură,

iar pereții lor sînt îndepărtați ; vasele Petri sînt izolate cu parafilm. Pentru obținerea unor bune rezultate, concentrația finală a polenului în mediu trebuie să fie pînă la 100 000/ml. Culturile de polen pot fi realizate în aceleași condiții ca și culturile de antere : o fotoperioadă de 12 ore (800 lucși), 25°C sau în întuneric. Cultivarea în întuneric scurtează timpul pentru embriogeneza haploizilor de 4—6 ori.

În cadrul celor mai reușite experiențe, 1% din polenul izolat a regenerat plante haploide după 10 zile de cultură fără antere.

Mediul de cultură III al anterelor (după Wernicke și Kohlenbach, 1977)

KNO_3	950 mg/l
NH_4NO_3	720
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	185
$CaCl_2$	166
KH_2PO_4	68
$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$	25
H_3BO_3	10
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	10
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,25
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,25
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	27,8
Na_2EDTA	37,8
Acid nicotinic	5
Glicină	2
Piridoxină-HCl	0,5
Tiamină-HCl	0,5
Acid folic	0,5
Biotină	0,05
Mio-inozitol	100
Sucroză	20 000

pH-ul ajustat la 5,5 ; sterilizare prin filtrare

Recuperarea plantelor haploide. Plantele cu frunze bine definite pot fi transferate din vasele Petri pe un mediu conținînd agar, cu o concentrație în săruri redusă (jumătate din concentrația mediului Murashige-Skoog, 1962) în vederea inducerii formării rădăcinilor. În continuare, plantele cu rădăcini vor fi trecute în ghivece ce conțin compost sau un amestec de turbă și nisip și vor fi acoperite cu folii de material plastic în vederea menținerii unei umidități constante. Verificarea numărului de cromozomi poate fi făcută în celule meristematice din vîrful rădăcinii.

9.3.3. Diploidizarea plantelor haploide

Plantele haploide pot fi diploidizate în vederea obținerii unor exemplare homozigote (fig. 37) prin următoarele metode.

— *Tratament cu colchicină.* Plantele încă nedetașate de antere sînt supuse unui tratament cu soluție de colchicină 0,5%, 24—48 de ore, după

care sînt spălate cu grijă și replantate. Asemenea tratament poate fi făcut și unor plante haploide mature, la care se aplică o pastă de colchicină cu lanolină 0,4% pe axilele frunzelor.

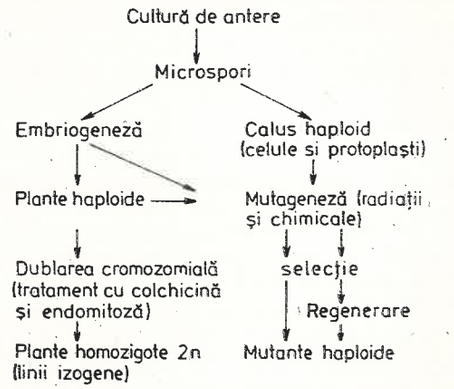


Fig. 37. — Obținerea de plante haploide, linii izogene și mutante la nivel haploid prin culturi de antere.

— *Culturi de segmente de tulpină.* În cultură, calusurile haploide suferă frecvent procese de endomitoză, formînd celule diploide, proprietate ce poate fi exploatată pentru obținerea unor plante diploide homozigote. În astfel de cazuri, segmentele de tulpină sînt cultivate pe un mediu conținînd auxină și citokinină, în vederea inducerii calusurilor (Nitsch și colab., 1972). Prin endomitoză se formează celule diploide homozigote, din care pot diferenția plante diploide izogenice.

— *Culturi de țesuturi ale unor frunze recoltate de pe plante haploide.* O condiție a reușitei constă în folosirea unui material sănătos. Procedeul comportă îndepărtarea laminei frunzei și sterilizarea superficială a nervurii mediane cu o soluție de etanol 70%, 2 minute. Urmează imersia, 6 minute, într-o soluție de hipoclorit de sodiu 8% și spălarea de mai multe ori în apă distilată. Materialul decontaminat este secționat în segmente de 5 mm care sînt plasate pe mediul de diferențiere în vase Petri. În cazul tutunului, compoziția mediului de diferențiere este identică cu cea a mediului folosit pentru cultura anterelor, numai că se folosesc 5 ml din soluția-stoc de kinetină, ceea ce dă o concentrație finală de 2 mg/l.

Vasele sînt acoperite sau, pentru menținerea unei umidități convenabile, sînt introduse în pungi de material plastic. Incubarea trebuie realizată la 25°C, în condiții de iluminare continuă. Sursa de lumină : lămpi fluorescente, iar intensitatea 300 lucși.

Primii lăstari apar după aproximativ 3 săptămîni și cînd au o lungime de 5 mm sînt detașați și transferați pe un mediu de înrădăcinare.

S-a constatat, în repetate rînduri, că gradul de ploidie depinde de vîrsta frunzelor de la care au fost recoltate țesuturile. Din frunze tinere sînt obținute cantități mari de plante haploide, din frunze adulte mari derivă atît plante haploide, cît și plante diploide, iar din frunzele senescente sînt regenerați aneuploizi și un amestec de plante triploide, diploide și haploide, în proporții imprevizibile.

Dacă din cauza vîrstei frunzelor folosite predomină plantele haploide se operează un transfer pe un nou mediu de înrădăcinare, în vederea dezvoltării masei de rădăcini. În cazul tutunului, mediul de înrădăcinare are o compoziție identică cu a celui pentru cultura anterelor, cu excepția hormonilor care nu se folosesc; de asemenea, cantitatea de agar este redusă la 5 000 mg, iar ceilalți componenți sînt reduși la jumătate din concentrație. După un interval de cîteva săptămîni sînt detașate segmente de 2—4 cm lungime din porțiunea de vîrf a rădăcinilor adulte, care sînt cultivate pe mediul de diferențiere. După un timp, încep să apară lăstari cu frunze, care sînt detașați în momentul în care se apropie de 5 mm lungime și sînt transferați pe mediul de înrădăcinare. Vîrfurile rădăcinilor obținute sînt supuse examenului citologic, pentru verificarea gradului de ploidie. În general, folosirea acestei metode s-a soldat cu obținerea unui material în care plantele diploide reprezintă cel puțin 75%.

Cultura de fragmente de tulpini dă rezultate bune cu condiția ca plantele haploide utilizate să fie foarte tinere.

Indiferent de metoda utilizată pentru obținerea de plante diploide, întotdeauna materialul trebuie verificat din punctul de vedere al gradului de ploidie. Uneori, o plantă haploidă selecționată are dublă destinație: păstrarea ca atare pentru studii ulterioare și, în același timp, diploidizarea în vederea obținerii de linii izogene. În asemenea situații, o tehnică de cultură a țesuturilor constituie un instrument deosebit de util, făcînd posibilă păstrarea plantei haploide și efectuarea tratamentului de diploidizare doar asupra unui țesut prelevat de la aceasta (Kasperbauer și Collins. 1972).

9.3.4. Obținerea plantelor haploide la tutun

Se folosesc muguri florali, care conțin antere al căror polen se află înaintea sau în timpul primei diviziuni, recoltați de pe plante sănătoase. De obicei, în cazul utilizării primilor muguri florali apăruți pe plantă sînt obținute rezultate mai bune decît atunci cînd materialul s-a recoltat de pe plante la care înfloritul a debutat de mai mult timp. Poate fi practicată atît recoltarea butonilor florali, cît și detașarea inflorescențelor întregi; în acest din urmă caz, capătul secționat trebuie introdus imediat în apă.

Mugurii florali pot fi luați imediat în lucru sau pot fi păstrați la 5°C, în frigider, 24—48 de ore. Faza optimă pentru folosirea mugurilor florali coincide cu momentul în care corola abia a început să se vadă din caliciu, moment care diferă de la o linie la alta, în funcție de stadiul meiotic; acest moment este considerat de Nitsch (1969) „stadiul 2", iar de Sunderland și Dunwell (1977) „stadiul 4". Cînd este necesară obținerea rapidă a unui mare număr de plante haploide dintr-o anumită linie pot fi recoltați numeroși muguri florali aflați în momentul descris și pot fi cultivate toate anterele, fără să se mai consume timp cu examinarea microscopică a unei antere. Dacă însă se urmărește creșterea procentului de antere din care pot fi obținute plante, este foarte util examenul microscopic al cîte unei antere din fiecare mugure floral.

Decontaminarea materialului trebuie efectuată într-o cameră sterilă. Dacă dimensiunile inflorescențelor sînt prea mari, făcînd manipularea dificilă, se poate recurge la desfacerea în segmente. Mugurii florali care

sînt fie mai mari, fie mai mici decît dimensiunile cerute sînt îndepărtați, iar materialul care rămîne este spălat mai întîi într-o soluție de etanol 70%, 30 secunde, apoi într-o soluție de hipoclorit de sodiu (clorox : apă 3/17), 5 minute (instrumentele sînt cufundate în etanol, după care sînt flambate și răcite înainte de a fi folosite). Materialul este transferat din soluția de hipoclorit în apă distilată, pentru o ultimă spălare, după care se trece la excizia anterelor în vase Petri. În continuare, anterele sînt plasate cît mai repede posibil pe mediul A (tabelul nr. 34) în vase Petri, flacoane sau tuburi.

Tabelul nr. 34

Compoziția mediului pentru cultura anterelor la tutun *

Constituenții	Soluția stoc (g/l)	Mediul de cultură	
		Stoc ml/l	Concentrația finală mg/l
EDTA	0,80	28	22,4
$Fe_2(SO_4)_2$	0,38	—	10,6
NH_4NO_3	82,50	20	1 650
KNO_3	95,00	—	1 900
H_3BO_3	1,24	5	6,2
KH_2PO_4	34,0	—	170,0
KI	0,166	—	0,83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,050	—	0,25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,0050	—	0,025
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	74,00	5	370
$MnSO_4 \cdot H_2O$	4,46	—	22,3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,72	—	8,6
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,005	—	0,025
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	88,00	5	440
Tiamină—HCl	0,02	5	0,1
Acid nicotinic	0,10	—	0,5
Piridoxină—HCl	0,10	—	0,5
Glicină	0,40	—	2,0
ANA	0,10	1,0	0,1
Kinetină	0,40	0,5	0,2
Sucroză	—	—	20 000
Agar	—	—	6 000
Mioinozitol	—	—	100

* Se calculează la 1 l apă distilată, iar pH-ul se ajustează la 5,8 cu 2N NaOH înainte de autoclavare la 121°C, 15 minute

După dispunerea anterelor pe mediu, vasele Petri sînt acoperite și se pun mai multe în cîte un sac din material plastic, care are rolul de a menține o umiditate convenabilă și de a proteja materialul de eventuale contaminări, în special cu ciuperci. Rezultate foarte bune pot fi obținute prin folosirea unei „camere de culturi", ce poate fi instalată pe o masă, la temperatura optimă de 25°C. Fără a fi contraindicată, lumina nu este esențială pe parcursul primelor săptămîni de cultură. Ea devine însă un factor important pentru prevenirea etiolării și formarea clorofilei, începînd din momentul apariției plantelor. Practic, culturile de antere pot fi supuse unei iluminări cu lămpi fluorescente (lumină albă), la o intensitate de 300 lucși, și unei temperaturi de 25°C. Pentru reducerea luminii, vasele Petri pot fi acoperite cu folii de aluminiu.

Plantele încep să apară după un interval de 4—5 săptămîni, în funcție de linia cultivată, temperatură și compoziția mediului de cultură.

Deși obținerea de plante haploide din antere de tutun nu necesită prezența auxinei și a citokininei, aceste substanțe pot fi incluse în mediu în vederea întîrzierii formării rădăcinilor. S-a ajuns la concluzia că plantele lipsite de rădăcini pot fi mai ușor separate, mai ales dacă își au originea în microspori individuali.

Primele plante formate sînt, aproape toate, haploide. În schimb, dintre plantele apărute mai tîrziu, un mare număr se pot diferenția din țesuturi parentale conținînd celule nehaploide. Ca urmare, după separarea primelor plante diferențiate, resturile de antere trebuie îndepărtate, iar plantele se transferă pe mediul de înrădăcinare (R) cînd au o lungime de cel mult 3 mm.

Pe parcursul perioadei de înrădăcinare, plantele trebuie plasate într-o cameră de cultură, la 22°C și în condițiile unei fotoperioade de 12 ore realizată cu ajutorul unor lămpi fluorescente, furnizînd lumină albă, la intensitatea de 5 000 lucși. Folosirea lămpilor cu incandescență este contraindicată din cauza excesului nedorit de căldură pe care acestea îl pot crea într-o atmosferă ce trebuie strict controlată.

După aproximativ 10 zile în aceste condiții, fiecare plantă este înregistrată și se colectează vîrfurile de rădăcini pentru examenul citologic al gradului de ploidie. Este o verificare extrem de importantă, mai ales atunci cînd, în continuare, se urmărește diploidizarea materialului haploid obținut. Următorul transfer al plantelor haploide, care acum au format și rădăcini, este realizat în ghivece de mici dimensiuni, pe un substrat adecvat.

În cursul săptămînilor care urmează, intensitatea luminii trebuie sporită treptat, pînă la nivelul luminii solare, iar în momentul în care plantele au atins dimensiunile dorite poate fi practicat transplantul în ghivece de dimensiuni mari, tot în seră, sau se poate face transferul direct în cîmp.

În cazurile în care în culturile de antere predomină calusurile nediferențiate acestea sînt transferate pe un mediu de diferențiere.

10 Metode de izolare și cultură a protoplaștilor

Protoplaștii sînt celule vegetale lipsite de peretele celular pectocelulozic. Datorită acestei caracteristici ei sînt utilizați în cercetările de inginerie genetică pentru: hibridarea celulară, transferul de ADN și organite celulare etc. (fig. 38).

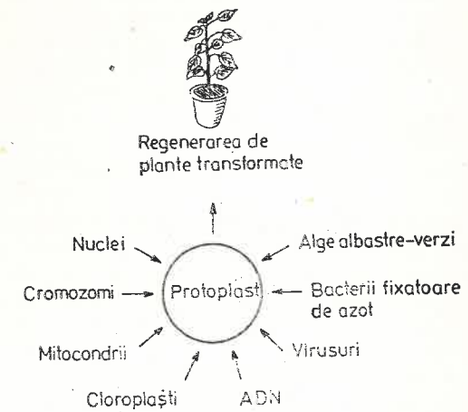


Fig. 38. — Posibilitățile de folosire a protoplaștilor în cercetările de genetică.

10.1. Metode de izolare a protoplaștilor

Procedeul-standard constă în tratarea celulelor sau a țesuturilor cu un amestec de enzime, care degradează peretele celular. Eficacitatea acestui amestec depinde, în bună măsură, de rezistența pereților celulari, care diferă în funcție de țesutul de origine. În cazuri extreme, peretele celular poate fi pregătit pentru digestia enzimatică prin adăugarea în mediu a unor auxine, aminoacizi cu sulf, agenți reducători sau ioni ai metalelor grele, care afectează plasticitatea pereților celulari sau punțile — S-S — din structura acestora. Tratamentul se face cu soluții ce conțin stabili-

zatori osmotici care au rolul de a suplini presiunea peretelui celular şi de a asigura, în acest fel, stabilitatea membranei. Creşterea potenţialului osmotic al mediului poate fi realizat prin reducerea concentraţiei în zahăroză de la 4 la 2%.

Metodele de izolare impun cîteva etape importante (fig. 39).

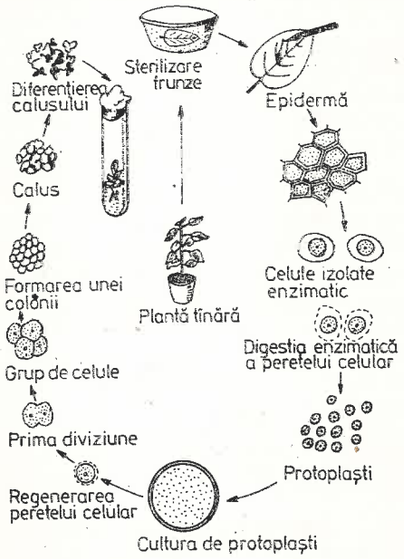


Fig. 39. — Schema obţinerii protoplaştilor şi a regenerării de plante.

Alegerea materialului vegetal. Cantităţi mari de protoplaşti pot fi obţinute din culturi de celule în suspensie sau din ţesuturile parenchimatice ale frunzei, dar ei nu pot fi cultivaţi în mod satisfăcător. Una dintre cele mai bune surse de protoplaşti o constituie celulele mezofilului frunzei.

Succesul operaţiunii de izolare a protoplaştilor depinde de următorii factori de creştere:

— *intensitatea luminoasă*, care trebuie menţinută între 500 şi 1 000 $\mu W/cm^2$; unele specii, printre care cartoful, au nevoie de o intensitate luminoasă mai mare;

— *regimul de lumină*, care trebuie să includă o perioadă de întuneric de cel puţin 6 ore din 24;

— *temperatura*, care poate oscila în intervalul 20—25°C, cu excepţia perioadei de întuneric, cînd este recomandabil să fie menţinută la un nivel ceva mai scăzut;

— *umiditatea relativă*, al cărei nivel se poate situa în intervalul 60—80%;

— *fertilizarea cu azot*, esenţială pentru obţinerea de protoplaşti la unele specii.

Cantităţi mari de protoplaşti s-au izolat din culturi de lăstari de la tutun şi petunie, care prezintă o serie de avantaje: uniformitate fiziologică (consecinţa condiţiilor de creştere controlate), reîntinerirea materialului

la fiecare transfer, absenţa contaminării. Practic, cultura lăstarilor prezintă aceleaşi caracteristici ca şi culturile de ţesuturi şi celule.

O serie de autori au încercat să folosească şi alte organe ca surse de protoplaşti. În majoritatea cazurilor însă, materialul obţinut a fost inferior din punctul de vedere cantitativ şi calitativ celui izolat din ţesuturile parenchimatice ale frunzei. Un interes aparte prezintă doar protoplaştii izolaţi din tetradele polenice şi din celulele-mamă ale polenului, datorită faptului că sînt haploide şi de mici dimensiuni. Se pare însă, că sînt greu de cultivat *in vitro*. Pentru realizarea de hibridări celulare protoplaştii meiotici constituie un material excelent.

Tratamentul enzimatic. Cel mai des se recurge la complexul enzimatic cunoscut sub denumirea de „celulază Onozuka", furnizat de All Japan Biochemical Co. (Nishinomiya, Japonia), hemicelulaze şi pectinaze furnizate de Kyowa Hakko Kogyo Co, Ltd. (Tokio, Japonia); celulaza Onozuka este folosită frecvent în combinaţie cu o pectinază.

În linii mari, se disting metode cu una şi cu două trepte. Metodele cu două trepte, numite şi secvenţiale, implică un prim tratament cu macerozimă sau pectinază pentru degradarea lamelei mijlocii şi separarea celulelor, urmat de un tratament cu celulază, vizînd degradarea peretelui celular. Cel mai frecvent utilizate sînt însă metodele cu o singură treaptă care implică folosirea drizelazei. Între diferitele loturi ale acestei enzime există însă diferenţe calitative nete: unele sînt mai active asupra ţesuturilor frunzei, iar altele asupra celulelor din culturi în suspensie. Trebuie ţinut cont de posibilitatea ca unele preparate enzimatice comerciale să nu fie purificate. Îndepărtarea completă a peretelui celular, atît de complex, este condiţionată, printre altele, şi de folosirea unor amestecuri enzimace lipsite de substanţe toxice şi impurităţi. Folosirea unei concentraţii enzimatice prea mici duce la creşterea duratei tratamentului, care nu este suportat de toate tipurile de celule.

Atunci cînd plantele din care urmează să fie izolaţi protoplaştii au fost cultivate în seră, în condiţii de variaţie a intensităţii luminii, este necesar un pretratament al ţesutului ales cu o soluţie care conţine ioni ce stabilizează membrana (Ca, Mg, K).

10.2. Metode de cultură a protoplaştilor

În prezent, pentru cultura protoplaştilor sînt folosite atît medii lichide, cît şi solide.

Metode de cultură în mediu lichid. Protoplaştii sînt incubaţi în vase Petri, într-un strat subţire de mediu lichid. Recipientele sînt lipite cu parafilm, iar incubaţia are loc la 25—28°C, în condiţii de intensitate luminoasă scăzută sau chiar la întuneric.

Protoplaştii pot fi incubaţi şi în vase Erlenmayer, cu o capacitate de 50—100 ml, în 5 ml mediu lichid. Incubaţia are loc în regim static, la 25°C şi în condiţiile unei intensităţi luminoase de 200 lucşi (Takebe şi Nagata, 1973; Coutts şi Wood, 1975).

Protoplaştii pot fi cultivaţi în suspensie, în picături de mediu de 50—100 μl, distribuite în vase Petri. Recipientele sînt lipite cu parafilm. Incubaţia este realizată în boxe de plastic, la 25—28°C, în condiţii de umiditate adecvată şi intensitate luminoasă redusă (100—500 lucşi) sau chiar în întuneric (Constabel, 1975).

Metode de cultură pe mediu solid cu agar. După ce protoplaştii regenerează pereţii celulari în mediu lichid, sînt transferaţi, pentru dezvoltare ulterioară, pe mediu cu agar, pe care pot fi cultivaţi superficial sau incorporaţi direct în mediu. Deoarece protoplaştii au o mare afinitate unii faţă de alţii, putînd agrega în mediu lichid, se include în mediul de cultură 0,04% agar (Shepard şi Totten, 1975).

10.2.1. Condiţiile necesare pentru realizarea culturilor

Condiţii osmotice. Presiunea peretelui celular trebuie înlocuită de presiunea osmotică a amestecului enzimatic şi, ulterior, a mediului de cultură. Transferul celulelor sau al ţesuturilor într-o soluţie plasmolizantă induce o stare de stres, cu efecte mai mult sau mai puţin nocive asupra metabolismului şi creşterii. Condensarea ADN în nucleu şi încetinirea ritmului de formare a proteinelor sînt două din efectele reversibile. În schimb, sinteza materialului peretelui celular este net modificată de natura şi presiunea osmotică. Un potenţial osmotic redus induce schimbări în sinteza hormonilor de creştere. În acest context devine deosebit de importantă presiunea osmotică medie a celulelor mezofilului în momentul izolării protoplaştilor.Protoplaştii pot fi induşi să se dividă, să formeze calusuri şi în unele cazuri să regenereze plante cu o eficienţă relativ ridicată cu condiţia ca reducerea presiunii osmotice să nu fie realizată de la început.

O cale de reducere a presiunii osmotice interne constă în păstrarea plantelor întregi sau numai a frunzelor la întuneric timp îndelungat. În general, reducerea potenţialului osmotic se face prin adăugare de manitol, sorbitol, glucoză sau zaharoză, atît în amestecul de enzime, cît şi în mediul de cultură; manitolul şi sorbitolul sînt cel mai des folosiţi, separat sau în combinaţie. Uneori se poate recurge şi la săruri minerale.

Folosirea stabilizatorilor osmotici metabolic activi (glucoză, sorbitol, zaharoză), alături de stabilizatori osmotici metabolic inerţi (manitol), poate fi avantajoasă, deoarece aceste substanţe vor fi folosite treptat de protoplaşti în primele etape de creştere şi regenerare a peretelui celular, ducînd la reducerea treptată a presiunii osmotice. Acest procedeu exclude o schimbare bruscă a potenţialului osmotic atunci cînd celulele regenerate sînt transferate pe un mediu nutritiv pentru creştere (Vasil, 1976).

Spălarea şi purificarea. Prima etapă a purificării protoplaştilor izolaţi constă în filtrarea prin site de nylon sau muselină în vederea înlăturării fragmentelor mari de ţesuturi nedigerate. Pentru înlăturarea soluţiei enzimatice se recurge la centrifugare repetată şi la resuspendare. O spălare prea intensă se poate solda cu reducerea viabilităţii protoplaştilor.

Kanai şi Edwards (1973) au pus la punct o soluţie care permite separarea protoplaştilor în gradient de densitate. Amestecarea acestei soluţii cu 0,13 volume de suspensie brută de protoplaşti şi centrifugarea la 300 rpm, timp de 6 minute, duce la separarea în două faze. Soluţia

conţine polietilen-glicol, dextran, fosfat de sodiu şi sorbitol. Larkin (1976) a obţinut o bună purificare folosind o soluţie care conţine 9,6% metrizoat de sodiu şi 5,6% ficol. Protoplaştii sînt colectaţi în interfază, iar resturile sînt sedimentate pe fundul tubului de centrifugare.

Aceste metode sînt excelente pentru separarea protoplaştilor de impurităţi, dar mai puţin eficiente în eliminarea soluţiilor enzimatice. În acest scop, cel mai frecvent se recurge la centrifugarea repetată.

Viabilitatea protoplaştilor. Înainte de folosire este necesară determinarea viabilităţii protoplaştilor. Printre metodele mai frecvent folosite, sînt următoarele:

— determinarea ciclazei ca indicator al unui metabolism activ;

— excluderea colorantului albastru Evans de către membranele intacte;

— urmărirea variaţiilor dimensiunilor protoplaştilor intacţi odată cu modificările osmotice;

— determinarea metabolismului respirator prin măsurarea consumului de origen;

— determinarea activităţii fotosintetice;

— depistarea celulelor intacte cu ajutorul fluorescein-diacetatului (FDA). Celulele intacte devin fluorescente ca urmare a acumulării fluoresceinei în membrane.

În unele cazuri, viabilitatea protoplaştilor este determinată urmărind comportarea culturii *in vitro*, în condiţii aseptice.

Medii pentru cultura protoplaştilor. Întrucît cerinţele nutriţionale sînt similare, protoplaştii se cultivă pe mediile folosite pentru culturile de celule, cu mici modificări. Una dintre aceste modificări constă în diluarea mediului. Rezultatele unor teste oferă indicaţii conform cărora concentraţiile de fier, zinc şi amoniu folosite în unele medii de cultură a ţesuturilor sînt prea mari pentru culturile de protoplaşti. Kao şi colab. (1973), Meyer (1974) şi Upadhya (1975) au arătat efectele negative ale amoniului asupra supravieţuirii protoplaştilor de tutun şi cartof. Pentru protoplaştii izolaţi din mezofilul frunzelor de mazăre, concentraţiile optime de fier şi zinc par să fie de 50 μM, respectiv 10 μM, sensibil mai mici decît în cazul unor culturi de ţesuturi. În schimb, concentraţia de calciu poate fi de 2—4 ori mai mare decît în mediile folosite în mod curent pentru culturi de celule.

Diferenţe nete privind exigenţa faţă de compoziţia mediului de cultură pot să apară şi între protoplaştii aparţinînd aceleiaşi specii. Uchimiya şi Murashige (1976) au constatat că protoplaştii izolaţi din culturi de celule de tutun nu pot creşte pe mediul Nagata şi Takebe (1971) folosit pentru cultivarea protoplaştilor izolaţi din mezofilul frunzelor de tutun. În asemenea cazuri, diferenţele par să se refere mai ales la necesarul de compuşi anorganici.

Uchimiya şi Murashige (1976) au demonstrat că necesarul de zaharuri este mai mic la protoplaştii de tutun decît în culturile de celule obişnuite aparţinînd aceleiaşi specii. Atît pentru regenerarea pereţilor celulari, cît şi pentru diviziune, nivelul optim a fost de 1,5%. S-a constatat, de asemenea, că protoplaştii de tutun cresc aproape la fel de bine atît pe

medii conținînd zaharoză, cît și pe medii conținînd celobioză sau glucoză. În cazurile în care protoplaștii au fost izolați din culturi de celule în suspensie, necesarul de zaharuri în mediu este același ca la culturile de țesuturi (3—4%). În schimb, protoplaștii izolați din celulele mezofilului frunzei de tutun pot crește și în absența unui adaos de zahăr în mediul lichid. Aceasta, probabil, datorită faptului că în condiții de cultură optime, cloroplaștii rămîn funcționali și deci capabili de fotosinteză *in vitro*. Protoplaștii izolați din mezofilul unor frunze de mazăre necesită pentru creștere 2—3% zaharoză exogenă, întrucît dezvoltarea cloroplaștilor este suprimată. S-ar părea deci că nivelul zaharurilor exogene în mediu depinde de sursa materialului și de condițiile de cultură.

În general, pentru cultura protoplaștilor sînt folosite aceleași vitamine ca și în mediile-standard pentru cultura țesuturilor.

Includerea azotului organic în mediu se face prin adăugarea de aminoacizi.

Pentru inducerea reconstituirii peretelui celular și diviziunii celulare sînt necesare o serie de auxine și citokinine. Uchimiya și Murashige (1976) au observat o creștere considerabilă a numărului protoplaștilor care au regenerat peretele celular și au reluat diviziunea în prezența acidului naftilacetic în mediu, în concentrație de 0,6 mg/l. Aceiași autori au constatat că într-o cultură de protoplaști obținuți dintr-o suspensie de celule de tutun, acidul naftilacetic a fost mai eficient decît 2,4-D și acidul indolacetic. Printre citokininele cel mai des utilizate în mediile pentru cultura protoplaștilor se numără benziladenina, kinetina și 6-3-metil-2-butan-1-aminopurina. Concentrația optimă a hormonilor în mediu diferă de la o cultură la alta și este stabilită prin teste.

10.2.2. Cultura protoplaștilor și regenerarea de plante

Protoplaștii proaspăt izolați sînt suspendați în mediul de cultură lichid, la o densitate de aproximativ 10^5/ml. O cantitate de 2 ml din această suspensie este pusă într-un vas Petri de capacitate mică și se amestecă cu un volum, din același mediu, care conține 1,2% agar. În momentul amestecării trebuie ca temperatura mediului să nu depășească 45°C. Pentru a nu se usca materialul, vasele Petri sînt lipite cu parafilm. Apoi, culturile sînt incubate în poziție inversă, la 25—28°C. Densitatea mare a protoplaștilor și intensitatea luminoasă sînt critice pentru o eficiență de inoculare maximă. În general, pare să fie optimă o densitate de $5 \cdot 10^4$ pînă la $5 \cdot 10^5$/ml. Enzmann și Becker (1973) au constatat un spor al activității metabolice la protoplaștii de tutun prin incubare, timp de două zile, la o intensitate luminoasă mică (300 lucși) și transferul ulterior la o intensitate luminoasă sporită (3 000 lucși).

În mod normal, pentru inducerea diviziunii în protoplaști, inocularea mediului trebuie realizată la o densitate finală mai mare de 10^4/ml. Dar, la o asemenea densitate este greu să fie separate colonii avînd originea în cîte o singură celulă. Raveh (1973) au folosit protoplaști iradiați care nu se mai divid ca suport de hrănire ce asigură diviziunea protoplaștilor viabili, inoculați la o densitate de numai 10^2/ml. Această tehnică facilitează selecția coloniilor derivate din cîte o singură celulă.

Regenerarea peretelui la protoplaști în cultură începe după cîteva ore și poate continua timp de mai multe zile. Prezența peretelui nou sintetizat poate fi evidențiată fie prin plasmolizarea celulei reconstituite, fie prin colorarea cu Calcofluor 0,1% (colorant fluorescent alb). Un studiu al procesului de regenerare poate fi realizat prin microscopie electronică.

După regenerarea peretelui, celula reconstituită prezintă o creștere considerabilă a dimensiunilor. Prima diviziune este observată după 3—5 zile, a doua după circa o săptămînă, iar după încă o săptămînă se formează agregate de celule. După trei săptămîni sînt vizibile colonii de culoare verde deschis, care ating în aproximativ 6 săptămîni dimensiuni de circa 1 mm.

Prima etapă a procesului de regenerare a plantelor implică transferarea calusului pe un mediu capabil să inducă diferențierea. Principiile generale aplicabile la culturile de țesuturi sînt valabile și pentru calusurile obținute din protoplaști.

10.3. Izolarea protoplaștilor din frunze

Izolarea protoplaștilor din frunze implică următoarele patru etape: 1. sterilizarea frunzelor, 2. înlăturarea epidermei, 3. tratamentul enzimatic, 4. izolarea și spălarea protoplaștilor.

Sterilizarea frunzelor este realizată prin imersie în alcool etilic 70%, 1 minut, apoi în soluție de hipoclorit de sodiu (2%), 20—30 minute, și spălare de trei ori cu apă distilată sterilă pentru înlăturarea urmelor de sterilizant. Manipulările ulterioare sînt efectuate numai în condiții de asepsie. Frunzele, a căror epidermă inferioară este îndepărtată cu atenție, sînt tăiate în bucăți mici. Din aceste bucăți, ca și din epiderma detașată pot fi obținuți separat protoplaști.

Izolarea protoplaștilor poate fi realizată prin două metode.

Metoda directă (comportă o singură etapă). Segmentele de frunză de pe care a fost înlăturată epiderma sînt introduse, cu fața inferioară în jos, într-un vas Petri care conține o soluție filtrată dintr-un amestec de enzime (0,5% macerozimă + 2% celuloză Onozuka, 13% sorbitol sau manitol, la un pH 5,4), și incubate pe timpul nopții 15—18 ore la 25°C (Power și Cocking, 1970).

După incubare, segmentele sînt ușor tasate pentru a elibera protoplaștii. Îndepărtarea resturilor de frunză este realizată prin filtrare, iar soluția cu protoplaști este transferată în tuburi de 13 × 100 mm, închise cu dopuri filetate, și centrifugate la 100 rpm, 1 minut. Protoplaștii vor forma depozitul, iar supernatantul conținînd resturi va fi înlăturat cu atenție. Procedeul este reluat de trei ori, protoplaștii fiind spălați de două ori cu soluție de sorbitol 13% și o dată cu soluție de zaharoză 20%. Regimul de centrifugare: 200 rpm, 1 minut. Protoplaștii, aflați în final în supernatant, sînt preluați cu pipete Pasteur.

Metoda secvențială (comportă două etape), implică într-o primă etapă izolarea celulelor și, ulterior, transformarea acestora în protoplaști.

Etapa I-a. Segmentele de frunze sînt imersionate într-un amestec enzimatic A (macerozimă 0,5% și potasiu dextran sulfat 0,3% în 13% soluție de manitol, la un pH 5,8). Ansamblul este filtrat în vacuum, într-un exsicator timp de 5 minute, apoi transferat într-o baie de apă, la 25°C, unde se agită ușor. După 15 minute, prima soluție enzimatică este înlocuită cu un amestec enzimatic proaspăt, iar segmentele de frunze sînt incubate timp de o oră. În această fază este indicat să se observe la microscop o picătură din amestecul incubat pentru a se controla separarea celulelor. Filtrarea este realizată printr-o pînză de nylon. Regimul de centrifugare este de 100 rpm, 1 minut, iar spălarea este efectuată de trei ori în soluție de manitol 13%.

Etapa a II-a. Celulele izolate în prima etapă sînt incubate în amestecul de enzime B (2% celuloză în 13% soluție de manitol, la un pH 5,4), timp de 90 minute, la 30°C. După incubare, ansamblul este centrifugat la 100 rpm, 1 minut, supernatantul este înlăturat, iar protoplaștii, care au format depozitul, sînt spălați de trei ori cu manitol. Purificarea protoplaștilor astfel izolați este efectuată într-o soluție de zaharoză 20—25% (Power și Cocking, 1970). Kanai și Edwards (1973) au folosit pentru separarea protoplaștilor sănătoși un sistem apos în două faze, obținut prin amestecarea polietilenglicolului cu dextran.

Metoda directă permite obținerea unor cantități mai mari de protoplaști izolați atît din mezofilul lacunar, cît și din mezofilul palisadic, spre deosebire de metoda secvențială prin care se obțin protoplaști doar din mezofilul palisadic; aceștia din urmă sînt însă mai utili pentru efectuarea culturilor celulare. În cazul metodei directe, perioada mare de incubare (15—18 ore) pare să afecteze în mod ireversibil plasmalema, influențînd creșterea ulterioară a protoplaștilor. Avantajul metodei directe constă în faptul că în timpul izolării, în urma unor fusiuni spontane, pot să apară protoplaști cu mai mulți nuclei.

10.4. Izolarea protoplaștilor din suspensii celulare

Suspensiile de celule tinere, în creștere, constituie un material ideal pentru izolarea protoplaștilor în cantități mari. După o prealabilă filtrare, suspensia este tratată cu celulază Onozuka 2,4% în 0,6 M manitol, 4—6 ore, la 30—33°C, într-o baie de apă care se agită ușor.

Uchimiya și Murashige (1974) au izolat protoplaști din suspensii celulare derivate din culturi de *Nicotiana tabacum* var. Bright yellow, adoptînd următoarea metodă:

— centrifugarea suspensiei celulare la 300 rpm, 10 minute;

— resuspendarea a 500 mg celule în 5 ml soluție de enzime (0,2% macerozimă R-10; 1% celulază Onozuka R-10; 0,5 M manitol) cu pH 5,7 ajustat cu 0,1 HCl N, sau NaOH în baloane DeLong de 50 ml;

— agitarea soluției pe un „shaker" (50—100 rpm, 3—4 ore, la 27°C;

— centrifugarea la 100 rpm, 2 minute, și resuspendarea protoplaștilor în manitol 0,7 M.

— spălarea protoplaștilor de trei ori cu manitol 0,7 M.

10.5. Izolarea protoplaștilor din polen

Protoplaștii izolați din polen constituie un material ideal pentru studii de mutageneză și hibridare somatică, oferind posibilitatea regenerării de plante haploide.

Protoplaști din polenul matur. Peretele polenului matur (exina) este de natură complexă și poate fi numai parțial degradat prin tratament enzimatic, limitînd cantitatea de protoplaști ce poate fi obținută.

Colectarea polenului se face prin zdrobirea sau agitarea anterelor mature. Polenul este sterilizat cu soluție de hipoclorit de sodiu 2%, 10 minute, apoi centrifugat la 300 rpm timp de 5 minute și spălat de două ori cu apă distilată. Incubarea se face cu diferite combinații și concentrații de enzime, în funcție de specie.

O serie de manipulări (agitarea cu o baghetă de sticlă, aspirarea cu o pipetă Pasteur sau presarea ușoară sub o lamă de sticlă) în timpul incubării pot facilita eliberarea protoplaștilor. Aceasta poate fi realizată prin diferite căi: prin porii de germinare; prin ruperea mecanică și detașarea exinei; prin dizolvarea parțială a exinei și prin formarea de subprotoplaști. La o concentrație mare de zaharoză (20%), germinarea normală este inhibată și prin fiecare por ies protoplaști de dimensiuni mai mici.

Protoplaști din celulele-mamă ale polenului și din tetrade. Tehnica de izolare comportă următoarele etape:

— colorarea unei antere dintr-un mugure floral tînăr cu acetocarmin pentru determinarea stadiului de dezvoltare. Dacă respectiva anteră conține tetrade sau celule-mamă ale polenului, mugurele este reținut;

— secționarea anterei în două jumătăți cu un bisturiu fin și prin apăsare ușoară cu o spatulă de sticlă se elimină conținutul sub forma unui lapte fluid;

— tratarea conținutului extras cu helicază (0,75% în soluție de zaharoză 8%), 30—45 minute, și agitare la fiecare 15 minute. Se folosește 1 ml enzimă per anteră;

— după incubare, amestecul de enzimă este înlăturat cu pipeta, iar protoplaștii sînt spălați de cîteva ori cu soluție de zaharoză. Matricea de celuloză care înconjură celulele-mamă ale polenului și tetradele este dizolvată în 10 minute, iar în 45 minute protoplaștii sînt eliberați în proporție de 100%.

10.6. Izolarea și cultura protoplaștilor la *Nicotiana tabacum*

Protoplaștii pot fi obținuți fie din suspensii celulare preparate din culturi de calus, fie din frunze intacte. În funcție de destinația ulterioară a materialului obținut, se poate recurge la două metode de izolare.

Obținerea protoplaștilor din frunze în condiții de presiune osmotică ridicată. Este un procedeu care a fost folosit inițial de Takebe și colab. (1968) în vederea obținerii de protoplaști destinați studiului infecțiilor virale. Ca osmotic este folosit manitolul. Prin această metodă se obține o populație relativ uniformă de protoplaști, derivați din celulele palisadice ale frunzelor. Metoda constă în următoarele:

— înlăturarea epidermei inferioare a frunzei cu o pensă fină;

— plasarea a 2 g de țesut într-un flacon de evacuare de 1 500 ml, care conține 20 ml dintr-o soluție de macerozimă R-10 (0,1%), potasiu dextran sulfat (1%) și 0,7 M manitol; iar pH-ul soluției este ajustat la 5,8 cu 0,1 HCl;

— filtrarea în vacuum a țesutului timp de 4 minute;

— plasarea flaconului într-un agitator (100 rpm) la temperatura camerei;

— după 11 minute, soluția de enzime este îndepărtată și se adaugă 20 ml soluție proaspătă de macerozimă. Se continuă agitarea, în același regim, timp de o oră;

— trecerea suspensiei prin mai multe straturi de pînză și colectarea celulelor izolate în suspensie;

— introducerea țesutului nedigerat într-un flacon care conține 20 ml soluție proaspătă de macerozimă și continuarea agitării timp de o oră. Urmează o a doua filtrare și culegerea a încă 20 ml de soluție conținînd celule izolate. După încă o reluare a procesului, sînt reunite într-un recipient toate filtratele, în total circa 60 ml. În continuare se procedează astfel:

— se spală celulele de două ori cu manitol 0,7 M care conține 0,1 mM $CaCl_2$; se centrifughează la 100 rpm, 2 minute, și se resuspendă în aceeași soluție; se centrifughează și se resuspendă în 40 ml soluție care conține 0,5% celulază și 0,7 M manitol; pH-ul este ajustat la 5,4 cu 0,01 N KOH;

— se incubă într-o baie de apă la 37°C, cu agitare orizontală;

— cînd cele mai multe celule au fost convertite în protoplaști liberi, situație determinată prin examen microscopic, protoplaștii sînt spălați de două ori cu 0,7 M manitol și 0,1 mM $CaCl_2$ prin centrifugare și sînt resuspendați în aceeași soluție.

Dacă protoplaștii obținuți pe această cale sînt destinați unor studii de infecție virală, inocularea trebuie realizată imediat.

Obținerea protoplaștilor din frunze în condiții de presiune osmotică scăzută. Reușita acestei metode depinde de respectarea riguroasă a condițiilor de creștere a plantei înainte de izolarea protoplaștilor. Ca osmotic este folosită zaharoza.

Procedeul descris de Shepard și Totten (1975) comportă sterilizarea frunzelor și păstrarea lor o noapte între foi de hîrtie de filtru sterilă, în frigider. Toate etapele următoare se desfășoară în condiții aseptice.

Pentru facilitarea pătrunderii enzimelor, epiderma inferioară este îndepărtată cu o pensă fină sterilă, iar limbul poate fi tăiat în benzi late pînă la 1 mm. Se iau 2 g de țesut care se plasează într-un balon cu o capacitate de 250 ml, ce conține 100 ml soluție sterilă formată din 0,1% macerozimă R-10, 0,5% celulaza R-10, 2% polivinilpirolidon (greutatea moleculară 10 000) și 0,2 M zaharoză; pH-ul este adus la 5,4. Urmează infiltrarea prin vacuum și incubarea la 30°C într-un agitator rotativ, la un regim de 40 rpm, timp de 4—6 ore. Protoplaștii sînt colectați prin filtrare cu ajutorul a patru straturi de pînză într-un vas Babcock de 16,5 cm. Centrifugarea este realizată într-o centrifugă Babcock, la 400 rpm, 5 minute. Pe parcursul acestei etape, protoplaștii viabili migrează centripet, formînd o bandă verde pe fundul recipientului. De aici sînt culeși cu o pipetă Pasteur și sînt introduși într-un vas Babcock conținînd soluție de zaharoză 0,25—0,4 M și o concentrație 1/10 din mediul I. În acest moment protoplaștii pot fi utilizați pentru regenerarea de celule și plante (tabelul nr. 35).

Tabelul nr. 35

Compoziția mediului pentru prepararea protoplaștilor și regenerare celulară (mg/l) (după Shepard și Totten, 1975)

Constituenți	Mediul I	Mediul II	Mediul III
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	—	180	—
NH_4NO_3	825	82,5	825
KNO_3	950	167	950
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	220	22	222
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 223	447,3	1 223
Na_2SO_4	180	180	—
KH_2PO_4	680	68	680
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	—	14,9	—
KCl	—	58,5	—
Na_2EDTA	37,3	3,7	37,3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	2,8	27,8
$Fe_2(SO_4)_3$	—	2,3	—
KI	0,83	0,76	0,83
H_3BO_3	6,2	2	6,2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	—	4,1	—
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	19,8	2	19,8
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	9,2	2,3	9,2
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,03	0,25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,003	0,025
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0,03	0,003	0,03
Mio-inozitol	100	39,7	100
Tiamină—HCl	1	0,19	1
Glicină	—	2,7	
Acid nicotinic	—	0,45	—
Piridoxină—HCl	—	0,1	—
Acid alfa-naftalenacetic	3	1,2	—
Acid indolacetic	—	—	4
6-benzilaminopurină	1	0,4	1
Kinetină	—	—	2,56
Sucroză	variabil	variabil	0,05—0,3 M
pH	5,6	5,6	5,6

Regenerarea de celule și plante de tutun. Uchimiya și Murashige (1974) au regenerat plante de tutun pornind de la protoplaști izolați din suspensie celulară folosind o metodă ce comportă următoarele operațiuni:

— Transferarea protoplaştilor în baloane DeLong de 50 ml, care conţin 5 ml mediu de cultură pentru protoplaşti; fiecare balon trebuie să conţină aproximativ 5×10^5 protoplaşti.

— Incubarea, fără agitare, la 27°C, la 1 000 lucşi, timp de 16 ore.

— Adăugarea, după 1—2 săptămîni, a unui volum egal de mediu de cultură proaspăt, care conţine 1,6% agar Bacto Difco; în locul manitolului se recurge la 0,3 M zaharoză;

— Trecerea unui volum de 2—3 ml din suspensie în vase Petri sterile de 10 × 55 mm; după incubare, timp de 1—2 luni pot fi obţinute calusuri cu un diametru de 2—3 mm.

— Transferarea calusurilor în tuburi de cultură de 25 × 150 mm care conţin 25 ml mediu de diferenţiere.

— Trecerea lăstarilor formaţi în tuburi de cultură care conţin mediu de înrădăcinare.

— Incubarea la 10 000 lucşi, timp de 2—4 săptămîni.

— Transferarea plantelor înrădăcinate în pămînt sterilizat şi creşterea lor în seră.

Shepard şi Totten (1975) au regenerat plante de tutun pornind de la protoplaşti izolaţi din frunze în condiţii de presiune osmotică scăzută, parcurgînd următoarele etape:

— Suspendarea protoplaştilor în mediul de cultură II, care conţine 0,59% ionagar nr. 2 şi 0,4 M zaharoză, la o densitate de $1—1{,}5 \cdot 10^4$ protoplaşti/ml.

— Trecerea a cîte 5 ml din amestecul protoplaşti — mediu de cultură cu agar în vase de sticlă de 250 ml; pentru formarea unui strat subţire de agar, vasele sînt plasate în poziţie orizontală.

— Incubarea la 21°C, sub lumină fluorescentă albă (400 lucşi); după 27 de ore, intensitatea luminii trebuie crescută la 700 lucşi.

— Adăugarea, după 2 săptămîni, a 2 ml mediu de cultură II (fără agar) şi înclinarea uşoară a baloanelor pentru a evita acoperirea suprafeţei agarului cu lichid.

— Diluarea de 10 ori a coloniilor, după 4 săptămîni de cultură, prin amestecarea într-un vas Petri de 10 cm a unui ml de suspensie cu 9 ml din mediul I care conţine 0,5 M zaharoză şi 0,7% agar (stratul de agar moale este rupt cu ajutorul unei baghete de sticlă, iar coloniile sînt dezagregate prin repipetare uşoară).

— Izolarea vaselor cu parafilm şi incubarea în boxe de polistiren, la 24—26°C şi 1 500 lucşi (lumină fluorescentă).

— Transferul coloniilor cu diametrul de 1 mm, de culoare verde, în vase Petri care conţin mediul III.

— Trecerea coloniilor al căror diametru a depăşit 5 mm şi care au diferenţiat lăstari în vase Pyrex, conţinînd 150 ml din mediul I (concentraţie 1/2), 0,025 M zaharoză şi 0,6% ionagar (fără hormoni).

— Izolarea vaselor cu parafilm şi incubarea sub lumină fluorescentă albă la 7 000 lucşi.

— Transferul plantelor din vasele Petri pe un substrat special, în condiţii de umiditate relativă a aerului de peste 85%.

— Transplantarea în sol a plantelor care au format rădăcini (tabelul nr. 36).

Tabelul nr. 36

Mediul pentru cultura protoplaştilor:

Săruri minerale din mediul Murashige-Skoog (mg/l)	
Sucroză	15 000
Manitol	110 000
Acid α-naftalenacetic	0,6
Kinetină	0,1
Tiamină-HCl	10
Piridoxină—HCl	10
Acid nicotinic	5
Mio-inozitol	100
Glicină	2

Mediul nutritiv cu agar pentru inducerea lăstarilor:

Săruri minerale din mediul Murashige-Skoog		
Sucroză	103	g/l
Tiamină—HCl	0,4	mg/l
Mio-inozitol	100	mg/l
Kinetină	2	mg/l
Acid indolilacetic	2	mg/l
Adenină sulfat $\cdot 2H_2O$	80	mg/l
$Na_2H_2PO_4 \cdot H_2O$	170	mg/l
L-tirozină	50	mg/l
Agar Bacto	800	ng/l

Mediul de înrădăcinare:

Săruri minerale din mediul Murashige-Skoog		
Sucroză	30	g/l
Tiamină—HCl	0,5	mg/l
Mio-inozitol	100	mg/l
Acid indolilacetic	2	mg/l
Agar Bacto	8	g/l

Determinarea viabilităţii protoplaştilor la microscopul optic în contrast de fază. O picătură din suspensia de protoplaşti se pune pe lamă şi se acoperă cu o lamelă. Protoplaştii viabili, preparaţi în condiţii de presiune osmotică scăzută, prezintă curenţi protoplasmatici clari (o mişcare ordonată a mitocondriilor şi microcorpusculilor); mişcarea este browniană. În cazul protoplaştilor izolaţi în condiţii de presiune osmotică ridicată, curenţii citoplasmatici sînt mult mai greu de observat, deoarece cloroplaştii formează un perete continuu la periferia protoplastului sferic, ascunzînd conţinutul. Totuşi, însăşi forma sferică, ca dealtfel şi existenţa acestui perete, indică faptul că protoplaştii sînt viabili. Protoplaştii neviabili au o formă neregulată şi cloroplaştii sînt aglomeraţi în grămezi dezordonate.

Colorarea protoplaştilor cu coloranţi vitali. Capacitatea de a fixa asemenea coloranţi cum este, de exemplu, roşul neutru, poate constitui un indiciu clar al viabilităţii protoplaştilor.

11 Metode de hibridare celulară

Hibridarea somatică este o tehnică introdusă recent, care s-a dovedit a fi extrem de prețioasă pentru aplicațiile sale în biologia celulară, genetică, embriologie, biologia tumorilor și virusologie. În esență, această tehnică presupune fuziunea spontană, respectiv indusă a unor tipuri diferite de celule din care rezultă celule hibride. În experiențele de fuziune au fost folosite o mare varietate de celule vegetale, animale și umane.

În cazul celulelor hibride interspecifice (om × șoarece, om × țînțar, pasăre × șoarece), celulele parentale diferă ca genotip și fenotip. Hibrizii intraspecifici se obțin prin fuzionarea unor tipuri de celule diferite aparținînd aceleiași specii (fibroblaste de șoarece × limfoblaste de șoarece), deosebirile dintre celulele parentale fiind numai de ordin fenotipic, adică morfologice, biochimice, imunologice și fiziologice.

Fuziunea dintre celulele somatice poate apărea spontan *in vitro* și *in vivo* sau poate fi indusă cu diverși agenți de fuziune în culturile de celule. Rezultă în acest fel două categorii de celule multinucleate (policarioni): cu același tip de nuclei (homocarioni), proveniți din același tip de celule parentale, și cu nuclei diferiți (heterocarioni), rezultați din celule parentale diferite, aceștia fiind considerați adevărați hibrizi (fig. 40).

În cazul în care supraviețuiesc, în urma fuziunii nucleare și a sincronizării diviziunii, heterocarionii devin celule mononucleate, adică sincarioni. Aceștia se pot menține și prolifera pe medii adecvate timp îndelungat, formînd clone celulare hibride (animale) sau calusuri din care pot regenera organisme întregi (hibrizi vegetali).

Celulele hibride proliferează în cultură, în unele cazuri mai repede decît cele parentale (vigoare hibridă), sau mai încet, ceea ce face posibilă aplicarea unor metode de izolare selectivă sau neselectivă. *Izolarea neselectivă* implică separarea mecanică a celulelor fuzionate din cultură și cultivarea lor ulterioară în scopul proliferării lor și obținerii de clone. Mult mai eficientă este *izolarea selectivă* a celulelor hibride dintr-un amestec de celule în cultură, folosind medii ce favorizează numai multiplicarea celulelor fuzionate.

Tehnica de fuziune celulară și izolarea de celule hibride sînt folosite în prezent pentru clarificarea unor aspecte de interes deosebit: de reglaj genetic, de creștere și diferențiere celulară în stări normale și patologice, de sinteză a imunoglobulinelor, de reglare a căilor metabolice. Fuziunea

celulelor normale cu celule tumorale, urmată de analiza *in vitro* și *in vivo* a caracteristicilor hibrizilor, a făcut posibilă pătrunderea în mecanismele intime ale proceselor neoplazice și punerea în evidență a prezenței virusu-

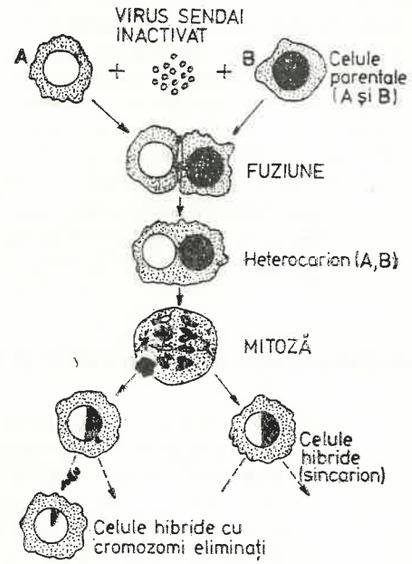


Fig. 40. — Schema fuziunii induse prin virusul Sendai a două celule mononucleate, A și B, provenind de la două specii, într-un heterocarion binucleat, care se divide pentru a forma două celule hibride mononucleare (sincarioni). Acest hibrid AB continuă să se dividă pînă ce, treptat, se elimină cromozomii ce aparțin celulei parentale B (după Ringertz și Savage, 1976).

rilor oncogene în cazul tumorilor latente. Realizarea hibrizilor interspecifici care pierd în mod preferențial cromozomii uneia din speciile parentale constituie un sistem ideal de cartare a genelor, fapt deosebit de important pentru medicina umană în problemele de diagnoză a erorilor înnăscute de metabolism. Prin intermediul înmulțirii parasexuate se pot realiza genotipuri noi, fie că sînt hibrizi între specii foarte îndepărtate filogenetic care nu se încrucișează sexuat, fie că fuzionează protoplaști ai aceleiași specii și se obțin celule cu diverse grade de ploidie; la nivelul protoplaștilor, fuzionați sau nu, se pot transfera nuclei, cromozomi sau gene, cloroplaști cu capacitate fotosintetică superioară, ce conferă caracteristici noi de rezistență și productivitate organismelor regenerate. Tot pe calea transferului de material genetic exogen se preconizează posibilitatea sintezei de proteine animale în celulele vegetale, fenomen deosebit de interesant atît din punct de vedere teoretic, fiind vorba de expresia unor gene animale la nivel vegetal, cît și practic, de rezultate beneficiind alimentația umană.

Primele cercetări privind fuziunea celulară. Primele observații privind fenomenul de fuziune între celule somatice aparțin lui Johanes Müller, în sec. XIX, care a remarcat prezența celulelor polinucleate ce apar adesea ca simptome caracteristice în anumite boli, cum sînt: tuberculoza, variola, varicela sau rubeola.

Totuși, abia în 1960, Barski, Sorieul și Cornefert raportează obținerea și izolarea unor celule hibride. Cultivînd împreună două linii celu-

lare de șoarece, ei au observat apariția unor celule hibride care se deosebeau de cele originale prin capacitatea de a produce tumori la șoareci histocompatibili, precum și prin numărul total și morfologia cromozomilor.

Deși inițial punerea în evidență a celulelor hibride a fost posibilă datorită creșterii lor diferențiate în raport cu celulele parentale, treptat apare necesară punerea la punct a unui sistem mai precis de selecție. În acest scop, Littlefield (1964) a folosit mediul HAT (Szybalski și colab., 1962), mediu ce conține hipoxantină, aminopterină și timidină, pe care a cultivat două linii celulare de șoarece deficitare în hipoxantină-guanină-fosforibozil-transferază (HCPRT) și respectiv timidinkinaza (TK).

Cercetările de hibridare somatică culminează în 1972 (Carlson și colab.) cu obținerea unor plante fertile, prin regenerare din calus provenit din fuziunea protoplaștilor de la două specii de tutun.

Cronologia principalelor evenimente în istoria hibridării celulare somatice

1960 Barski, Sorieul și Cornefert (1960, 1961) descoperă hibrizi celulari formați *in vitro* prin fuziune spontană celulară. Sorieul și Ephrussi (1961) confirmă aceste rezultate.

1957—1962 Okada (1958, 1962) demonstrează că virusul Sendai inactivat cu UV poate fi folosit la fuziunea celulelor *in vitro* pentru a forma homocarioni.

1963 Gershon și Sachs confirmă rezultatele lui Barski și colab.

1964 Littlefield introduce folosirea mediilor selective și a celulelor mutante pentru izolarea celulelor hibride.

1965 Harris și Watkins și independent Okada și Murayama, produc primii heterocarioni interspecifici folosind virus Sendai inactivat. Ephrussi și Weiss produc primii sincarioni interspecifici stabili prin fuziune spontană.

1966 Yerganian și Nell demonstrează că virusul Sendai inactivat poate fi folosit pentru a produce hibrizi stabili. Davidson, Ephrussi și Yamamoto, folosind melanoame și celule nepigmentate, demonstrează că un marker fenotipic al diferențierii histotipice (pigmentarea) poate fi selectiv pierdut la hibrizi.

1967 Weiss și Green descoperă eliminarea preferențială a cromozomilor umani în hibrizii om × șoarece și demonstrează că acest fenomen poate fi folosit în cartarea genelor la om. Watkins și Dulbecco, și independent Kaprowski și colab., demonstrează eliberarea virusului cînd din hibrizi derivați din celule transformate și tolerante lizogene ies particule active de SV_4.

1969 Harris, Klein și colab. încep experiențele care au demonstrat că malignizarea nu este dominantă în sincarionii derivați din celule normale și oncogene.

1970 Lucy și colab. încep experiențele de inducere a fuziunii cu lizolecitină. Cocking și colab. realizează fuziunea protoplaștilor la plante.

1971 Ruddle și colab., Miller, Siniscalce și Bootsma introduc folosirea sistematică a hibridării celulare ca sistem experimental pentru cartarea cromozomilor umani.

1972 Carlson, Smith și Dearing obțin plante hibride interspecifice prin fuziunea protoplaștilor de tutun *(Nicotiana glauca* × *N. langsdorfi)*.

1976 Lima-de-Faria împreună cu o echipă de cercetători din Szeged a reușit fuzionarea unor celule umane HeLa cu protoplaști de morcov cu ajutorul soluției de polietilenglicol.

1978 Smith și colab. obțin hibrizi între celule tumorale umane HeLa și protoplaști de tutun.

1977 Cocking și colab. obțin prin hibridare celulară somatică hibridul *Petunia hibrida* × *P. parodii*.

Wettstein și colab., precum și Melchers și colab., folosind fuziunea protoplaștilor, obțin hibridul *Lycopersicon esculentum* × *Solanum tuberosum*.

11.1. Hibridarea celulară la plante prin fuziune de protoplaști

La plante, prin utilizarea culturii protoplaștilor în hibridarea somatică se poate depăși incompatibilitatea sexuală și se pot înlocui metodele convenționale de ameliorare cînd acestea sînt ineficiente.

Plantele oferă două avantaje care nu pot fi întîlnite la sistemele animale: se pot cultiva celule haploide și se pot regenera plante întregi dintr-o singură celulă somatică, inclusiv din celule hibride. Aceste aspecte sînt de mare importanță atît pentru agricultură, cît și pentru biologia teoretică.

În mod ocazional s-au observat *fuziuni spontane* între protoplaștii plantelor (Küster în 1909). Îndepărtarea peretelui celular poate ea însăși determina apariția de celule polinucleate. Majoritatea acestor policarioni nu se formează prin fuziunea propriu-zisă, ci sînt rezultatul extinderii plasmadesmelor ce fac de obicei legătura prin porii pereților celulari între protoplasmele învecinate. Același fenomen apare în timpul tratamentului enzimatic între protoplaști alăturați.

Observații electronomicroscopice (Withers și Cocking, 1972) au arătat că degradarea enzimatică a peretelui celular rigid permite extinderea plasmadesmelor și apariția unor formațiuni multinucleate. Astfel de fuziuni spontane sînt strict *intraspecifice*, rezultînd totdeauna numai homocarioni. Formarea lor pare a fi corelată cu mărimea frunzelor (mult mai frecvent se formează din frunze tinere) și procentajul protoplaștilor care suferă fuziunea.

Spre deosebire de fuziunea spontană, *fuziunea indusă* include și fuziunea între specii diferite. La animale, pentru a induce fuziunea se folosește virusul Sendai inactivat, iar la plante un agent inductor care să provoace întîi alăturarea protoplaștilor liberi în mediu și apoi aderarea

lor unul la altul. Observații de ultrastructură (Withers și Cocking, 1972; Burgess și Fleming, 1974) au relevat faptul că în timpul fuziunii apare întîi o adeziune, membranele fuzionează în mici areale localizate care se extind treptat și eventual citoplasmele celor doi protoplaști se amestecă.

11.1.1. Metode de inducere a fuzionării protoplaștilor

Protoplaștii izolați din plante pot fuziona unii cu alții cu ajutorul mai multor agenți și tehnici de fuziune.

Metoda mecanică. Mitchel (1937) a folosit micromanipulatoare și micropipete de perfuzie pentru a provoca contactarea intimă a protoplaștilor izolați. Micropipetele sînt parțial blocate la capăt pe 1 mm printr-o vergea de sticlă, obligînd protoplaștii să se condenseze prin scurgerea lichidului. Prin această metodă s-au obținut ocazional protoplaști fuzionați la soia, *Arachis hypogea* și *Vinca rosea*.

Tratamentul cu nitrat de sodiu. Küster (1909) a observat pentru prima dată că protoplaștii de ceapă izolați și plasmolizați prin adăugare de săruri de sodiu în mediu fuzionează prin deplasmolizare, formînd homocarioni. Mitchel (1937) a obținut în mod experimental homo- și heterocarioni din protoplaștii celulelor parenchimatice și epidermale de la 6 genuri, specii de plante superioare și alge verzi. S-a obținut fuziunea prin suprapunerea protoplaștilor pe o lamă de microscop și plasmolizarea lor timp de 10—20 minute cu o soluție de 0,5 M nitrat de sodiu. Aglutinarea și fuzionarea au avut loc spontan.

Folosindu-se tot nitrat de sodiu ca mediu hipertonic netoxic, s-a reușit să se producă fuziuni intra- și interspecifice între protoplaști proveniți din rădăcini de ovăz și de porumb. Pentru aceasta, protoplaștii izolați au fost suspendați într-un amestec de agregare cu 5,5% nitrat de sodiu în soluție de 10% sucroză, păstrați într-o baie de apă la 35°C, pentru 5 minute, după care conținutul a fost centrifugat 5 minute la 200 rpm în vederea obținerii de agregate. Acestea au fost din nou transferate într-o baie de apă la 30°C pentru 30 minute. Între timp, cea mai mare parte a protoplaștilor au fuzionat. Amestecul de agregare a fost înlocuit treptat, fără a tulbura aglomerările de protoplaști, cu un mediu de cultură suplimentat cu 0,1% $NaNO_3$ în care protoplaștii fuzionați au fost păstrați un timp, apoi au fost spălați de două ori cu mediu de cultură și plasați în culturi.

În același scop au fost testate și alte săruri (clorură de calciu, nitrat de potasiu, nitrit de sodiu, clorură de sodiu) deoarece s-a observat că anumiți protoplaști fuzionează în timpul plasmolizei și deplasmolizei treptate într-un mediu hipotonic. Cel mai eficient însă s-a dovedit a fi nitratul de sodiu care se folosește în soluție standard de 0,25 M pentru fuziunea protoplaștilor izolați enzimatic. Același procedeu a fost folosit și de Carlson și colab. (1972), care au obținut plante hibride regenerate din protoplaști fuzionați aparținînd la două specii de tutun.

Tratamentul cu proteine de agregare. Urmărindu-se efectul unor proteine asupra agregării protoplaștilor de *Allium fistulosum*, *Brassica chinensis* și *Daucus carota* s-a constatat că gelatina și primii săi produși

de degradare, în concentrație de 2—5%, induc agregarea în procent ridicat timp de o oră.

Metoda imunologică. Hartmann și colab. (1973) au demonstrat o puternică aglutinizare a protoplaștilor din culturi în suspensie, la *Bromus*, *Glicine* și *Vicia*, de către serul imun preparat de la iepure. Anticorpii de soia și de *Bromus* provoacă, de asemenea, aglutinarea protoplaștilor de *Vicia*, care au supraviețuit și au prezentat diviziuni după tratamentul cu anticorpi.

Ionii de calciu și pH-ul ridicat, ca efect combinat, au fost folosiți de Keller și Melchers (1973) în realizarea fuziunii protoplaștilor de tutun. Peste 50% din protoplaști au fuzionat după ce au fost centrifugați 30 minute la 50 rpm și incubați la 37°C într-un mediu ce conținea clorură de calciu 0,05 M în 0,4 M manitol ajustat la pH 10,5, recentrifugați pentru 3 minute la 50 rpm, după care tuburile s-au păstrat în baie de apă la 37°C pentru 40—50 minute. Melchers și Labib (1974) au obținut plante întregi pornind de la protoplaști fuzionați prin această metodă.

Alți agenți. S-au mai folosit substanțe ca poli-L-ornitina, poli-D-lizina, concanavalina A, citocolazin B și protamin-sulfat, lizozima, glicerol și dimetil-sulfaoxid.

Grout și Coutts (1974) au observat că multe dintre substanțele chimice folosite produc reducerea mobilității electroforetice la nivelul protoplaștilor și au interpretat intensificarea endocitozei și a fuziunii, ca rezultat al respingerii și atracției electrice.

Polietilenglicolul (PEG) produce aglutinarea protoplaștilor și formarea heterocariocitelor în funcție de mai mulți factori: timpul de tratare cu soluții de enzime pentru a produce protoplaști; greutatea moleculară a concentrației soluției PEG; temperatura și durata tratamentului de fuziune; pH-ul amestecului de fuzionare; densitatea protoplaștilor și a celulelor.

În funcție de cantitatea de protoplaști, de originea și caracteristicile lor se folosesc diverse metode de inducere cu soluții PEG.

Metoda nr. 1

Pentru cazul în care se obțin protoplaști în cantități apreciabile, Wallin și colab. (1974) au propus următoarea metodă: se amestecă 1 ml din suspensia de protoplaști în mediul de cultură cu 1 ml soluție PEG 56% și se agită 5 secunde. Amestecul se lasă 10 minute să se sedimenteze protoplaștii, apoi se spală cu mediul de cultură și se examinează. Adăugarea de soluție de PEG duce la intensificarea aglutinării urmată de fuziunea protoplaștilor.

Metoda nr. 2

Cînd se lucrează cu microcantități de protoplaști, se folosesc culturile „în picătură". Se amestecă în cantități egale (4—6 micropicături, aproximativ 100 µl fiecare) două tipuri de protoplaști (Mitchayluk, 1974; Kartha și colab., 1974) într-un vas Petri mic, și se lasă 5—10 minute la temperatura camerei. Se adaugă apoi 2—3 micropicături din soluția de PEG la periferia suspensiei mixte de protoplaști, după care amestecul se incubă

30 minute, timp în care au loc aderarea și aglutinarea reciprocă a protoplaștilor; aglutinarea determină, de asemenea, și alipirea de peretele de sticlă a vasului Petri, fapt ce poate fi evitat parțial prin adăugarea de papaină la mediu (Constabel și Kao, 1974). De preferat este să se pună protoplaștii într-un vas Petri pe o lamelă, evitîndu-se astfel alipirea de suprafața vasului și favorizîndu-se, în același timp, fixarea și colorarea lor pentru a fi examinați. După tratamentul cu soluție PEG, aceasta este înlocuită treptat cu mediu de cultură. Fuziunea provocată de soluția PEG este favorizată și de adăugarea ionilor de Ca.

Protoplaștii izolați de la două surse pot fi amestecați în raport de 1 : 1 pînă la 1 : 4 în soluții care conțin stabilizatori de presiune osmotică și săruri de Ca (tabelul nr. 37.)

Tabelul 37

Soluții folosite la inducerea fuziunii cu PEG

Substanțe	Dispersie	Soluție PEG*	Eluție
Sorbitol (M)	0,5	—	0,2
Glucoză (M)	0,4—0,5	0,1— 0,2	0,3— 0,4
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (mM)	3,5—5,0	3,5—10,5	5 —10,5
$KH_2PO_4 \cdot H_2O$ (mM)	0,7	0,7— 2,0	—
Glicină (mM)	—	—	5,0
pH	5,8—6,8	5,8— 6,2	9,0—10,5

* 5g PEG (1540) în 10 ml.

Metoda nr. 3

Kao (1976), Gamborg și colab. (1974) au folosit o metodă adaptată pentru diverse sisteme celulare și animale. Protoplaștii proveniți din două surse, preparați simultan, se filtrează împreună prin site de oțel inoxidabil, cu ochiuri în diametru de 80 μ, într-un tub de centrifugă. Centrifugarea se face la 100 rpm pentru 3 minute, după care protoplaștii se resuspendă în soluție apoasă. Se repetă faza de centrifugare. Spălarea se face permițînd protoplaștilor să se depună în tub, apoi din supernatant se ia, cu o pipetă Pasteur, 0,1—0,2 ml, care se depune pe o lamă protejată de un vas Petri. Se lasă 5 minute pentru a permite celulelor să se așeze la suprafața sticlei, după care, în timpul examinării la microscop, se adaugă încet în picături mici 0,2 ml de soluție PEG, care acoperă suspensia de protoplaști, determinînd aglutinarea. Incubarea se face la temperatura camerei, 15—40 minute, în afara luminii directe. Se adaugă încet 0,5 ml soluție de eludare, de două ori, la interval de 10 minute, după care se așteaptă 5 minute.

Soluții pentru inducerea fuziunii protoplaștilor:

Soluție de spălare

Glucoză . . . . . 0,5 M
$CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$ . . . . . 3,5 mM
$KH_2PO_4 \cdot H_2O$ . . . . . 0,7 mM
pH — 5,7

Soluție PEG

PEG 1,540 sau 0,09 M PEG 6 000 . . . . . 0,33 M
$CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$ . . . . . 10,5 mM
$KH_2PO_4 \cdot H_2O$ . . . . . 0,7 mM
Glucoză . . . . . 0,1 M
pH — 5,5

Se prepară înainte de folosire

Soluție de eludare

1) $CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$ . . . . . 100 mM
Glucoză . . . . . 0,4 M
2) NaOH — glicină, tampon pH 10,5 . . . . . 100 mM
Glucoză . . . . . 0,4 M

Se prepară soluțiile 1 și 2 separat și se amestecă (1 : 1) înainte de folosire.

Protoplaștii se spală de soluția PEG prin următorul procedeu: se adaugă 0,3 ml din mediul de cultură (PCM = protoplast culture mediul) în suspensia de protoplaști, se așteaptă 5 minute, după care se înlătură 0,3 ml din lichid cu o pipetă Pasteur. Se repetă operația de 5 ori, astfel ca de fiecare dată să rămînă o parte din mediu, care să acopere protoplaștii în timpul spălării. Protoplaștii se cultivă în 0,2—0,4 ml PCM pe lame sau vase de sticlă. Pentru păstrarea vaselor umede se adaugă cîteva picături de mediu în jurul lamelei. Vasele Petri se închid ermetic și se incubează în lumină slabă (50 lucși). Diviziunile încep după 4—6 zile, iar în 2—4 săptămîni calusul devine vizibil. În această perioadă, în culturi se adaugă volume din ce în ce mai mari de PCM, a cărui concentrație osmotică descrește treptat. Cînd calusul ajunge la 2—3 mm se transferă în mediul de diferențiere.

Mediul de cultură pentru protoplaști (PCM)

A. *Soluția-stoc de macroelemente* (g/l)

KNO_3 25,0
NH_4NO_3 2,50
$CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$ 9,00
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 2,50
$CaH_2(PO_4) \cdot H_2O$ 50
$(NH_4)_2SO_4$ 1,34
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 1,50

B. *Soluția-stoc de microelemente* (mg/100 ml)

$MnSO_4 \cdot H_2O$ 1 000
H_3BO_3 300
$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 200
$Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$ 25
$CuSO_4$ 2,5
$CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$ 2,5

C. KI . . . . . 75 mg/100 ml

D. *Sursa de ioni* (g/l)

$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	5,57
Na_2EDTA	7,57

E. *Vitamine* (mg/100 ml)

Acid nicotinic	10
Tiamină HCl	100
Piridoxină-HCl	10
Mio-inozitol	1 000

F. Acid 2-4-diclorofenoxiacetic	1	mg/l
G. 6-benziladenină (6BAP)	1	mg/l
H. Acid α-naftalenacetic (NAA)	1	mg/l
I. N^6-dimetiladenină 21P	0,01	mg/l

Pentru 200 ml de mediu de cultură se amestecă soluțiile-stoc indicate anterior în volumele următoare:

A	20,0	ml
B	0,2	ml
C	0,2	ml
D	1,0	ml
E	0,2	ml
F	0,02	ml
G	0,02	ml
H	0,2	ml
I	0,2	ml
Lapte de cocos deproteinizat	4,0	ml
A-Z amină, tip A	50,0	ml
Xiloză	50,0	mg
Glucoză	13,7	g
H_2O	se aduce la	200 ml

Se ajustează pH-ul la 5,7 cu 0,1 N NaOH sau 0,1 N HCl; mediul se sterilizează prin filtru cu pori de 0,22 μm.

Acest mediu se folosește pentru diviziunea celulară și formarea de calus din protoplaști de *Nicotiana tabacum*, *N. glauca*, *N. langsdorfii*, *N. rustica*, *N. longiflora* și *N. debneyi*, ca și pentru alte solanacee și leguminoase.

Metoda nr. 4

Evans și colab. (1974) au folosit protoplaști de *Nicotiana tabacum*, *N. xanthi* și *N. otophora* (metoda este valabilă în special pentru studiul fuziunii acestor specii cu *N. otophora* care posedă blocuri heterocromatinice intranucleare ce se pot identifica cu ușurință în heterocarioni). S-au obținut protoplaști izolați din frunze prin folosirea unei presiuni osmotice ridicate (0,7 M manitol ca agent plasmolizant). Protoplaștii sedimentează prin centrifugare la 100 rpm, 5 minute, după care se resuspendă în soluție de săruri + sucroză și se centrifughează din nou la 200 rpm, 5 minute. Celulele și alte resturi sedimentează, iar protoplaștii vor pluti la suprafață și se transferă cu o pipetă Pasteur pe mediul de cultură.

Protoplaștii se centrifughează la 100 rpm, 5 minute, și se resuspendă în soluție proaspătă de săruri + manitol.

Se amestecă ambele surse de protoplaști în raport de 1 : 1 apoi se lasă să sedimenteze prin centrifugare la 100 rpm, 5 minute. Se resuspendă în mediul de cultură F5 ce conține 40% soluție de PEG (greutate moleculară 6 000), încălzită la 37°C.

Mediul de cultură F5 pentru fuziunea protoplaștilor (mg/l)
(după Frearson și colab., 1973)

$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	850
KNO_3	525
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	739
KH_2PO_4	353,6
$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$	11,15
H_3BO_3	3,1
$KnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	4,3
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,125
KI	0,498
$CoSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,015
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,025
Na_2EDTA	18,75
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	13,9
NH_4NO_3	412,5
Mezo-inozitol	100
Glicină	1
Tiamină-HCl	1
Acid nicotinic	5
Piridoxină-HCl	0,5
Acid folic	0,5
Biotină	0,05
Acid 1-naftalenacetic (NAA)	2
6-benzilaminopurină (6BAP)	1
Sucroză, greut./vol. ... procente	1
Manitol „ „ ... „	13
pH = 5,8	

În continuare se incubează o oră, la 37°C, după care se pot lua probe mici pentru examinare la microscopul optic. Se consideră că fuzionarea a început atunci cînd se observă 2 sau mai mulți protoplaști aderind unul de altul pentru a forma grupări sferice. Dacă fuziunile apar frecvent se înlătură soluția de PEG prin mai multe spălări cu mediul F5.

Pentru detectarea heterocarionilor se fixează probe mici din suspensia de protoplaști cu 4% tampon formaldehidă, pH 6,8, și 0,7 M manitol. Ceea ce rămîne din protoplaști se poate cultiva pe mediul F5. Protoplaștii fixați sedimentează și o picătură din acest sediment se pune pe o lamă de microscop împreună cu o picătură de colorant — carbol-fucsină (3% fucsină bazică în 70% etanol). Se acoperă cu o lamelă și se examinează în cîmpul optic luminat.

Pe această cale pot fi detectați heterocarionii de *N. otophora* × *N. tabacum*, deoarece nucleii unei specii conțin blocuri de heterocromatină, care sînt absente la cealaltă specie.

Mecanismul fuziunii protoplaştilor prin PEG. Introdus relativ recent în studiile de hibridare somatică la plante (Kao şi Michayluk, 1974), PEG este un polimer solubil în apă şi prezintă următoarea formulă structurală:

HO —HCH —HCH —O —/HCH —HCH —O/ —HCH —HCH —OH

(greutatea moleculară circa 7 500 daltoni)

Eficienţa sa în aglutinare şi fuzionare se datoreşte capacităţii de a forma legături ionice între constituenţii de suprafaţă ai celulei. Acest tip de legături pot face molecula uşor negativă în mediul apos şi poate servi la legarea proteinelor de suprafaţa încărcată pozitiv sau a glicoproteinelor încărcate negativ prin punţi de cationi bivalenţi (Ca^{++}) (Kao şi Michayluk, 1974; Constabel şi Kao, 1974).

Studiile de microscopie electronică în domeniul fuziunii celulare au arătat că soluţia PEG determină formarea unor punţi moleculare, provocate şi de ionii de Ca ce facilitează astfel disocierea/reasocierea membranelor plasmatice (Kao şi Constabel, 1974). Atît procesul adeziv, cît şi cel de fuziune par să reclame concentraţii diferite de soluţie PEG. Contactul de membrane se realizează în areale localizate pe suprafeţe mari, dar discontinue.

Soluţia PEG provoacă şi creşterea fluidităţii lipidelor (Erickson şi colab., 1974), stare care ar putea determina mişcarea proteinelor membranare şi a particulelor glicoproteice (Ahkong şi colab., 1975).

Fuziunea are astfel loc în mai multe puncte în care apar punţi citoplasmatice. Burgess (1974) a observat distorsiunea membranelor adiacente, ceea ce sugerează că acestea devin fluide şi lipicioase.

În timpul fuziunii, plasmalemele par să erupă în mai multe puncte, stabilindu-se continuitate între protoplaştii adiacenţi. Marginile externe ale protoplaştilor se unesc, iar secţiunile intermediare formează vezicule care se degradează treptat (Burgess, 1974; Fowke şi colab., 1975). Organitele celulare migrează către periferia celulelor fuzionate şi se amestecă formînd vacuole în contact strîns. Amestecul citoplasmic este complet cînd fuzionează tonoplastele. În unii heterocarioni, organitele unei specii îşi păstrează structura normală, în timp ce ale celeilalte specii apar degenerate.

În general, amestecul complet al citoplasmelor are loc după 12 ore, timp în care se înlocuieşte soluţia PEG cu mediul de cultură izotonic.

11.1.2 Identificarea protoplaştilor fuzionaţi şi a hibrizilor somatici

Protoplaştii izolaţi, fuzionaţi sau nu, pot fi consideraţi viabili dacă îşi regenerează peretele celular şi se divid. Esenţial însă este faptul că expresia potenţialului lor genetic şi creşterea sînt mult amplificate. Este de notat, de asemenea, şi într-un caz şi în celălalt, capacitatea de a regenera plante întregi. Cînd produşii de fuziune sînt cultivaţi pe un mediu adecvat, ei îşi refac peretele celular în 24 de ore.

Identificarea celulelor fuzionate se bazează pe: colorarea diferită a heterocarionilor (Dudits, Gamnorg şi Kao, 1976), morfologia distinctivă a cromozomilor (Kao, 1977) şi a cloroplaştilor ce diferă în conţinutul de clorofilă, dimensiunile structurilor grana sau stroma şi a incluziunilor (Weber, Kirkpatrick şi Constabel, 1976; Michayluk, 1974).

Celulele fuzionate au fost examinate cu ajutorul microscopului electronic. Folosind diferite tehnici de colorare s-a arătat că heterocarionii conţin unul sau mai mulţi nuclei, raportul obişnuit fiind de 1 : 1, 2 : 5 pentru nucleii paterni, în timp ce produşii de fuziune cu un număr mai mare de nuclei se deteriorează în timp. Chiar dacă protoplaştii multinucleaţi prezintă diviziuni simultane, apar fusuri de diviziune neregulate, iar citokineza în celulele-fiice este incompletă (Fowke şi colab., 1975). În studiile efectuate pe heterocarioni intergenici, Constabel şi colab. (1971) au constatat că atunci cînd nucleii sînt distribuiţi la o anumită distanţa unul de celălalt pot rezulta mitoze separate.

Pe de altă parte, dacă nucleii sînt adiacenţi poate să apară fuziunea nucleilor în interfază. În acest caz, atît la homocarioni, cît şi la heterocarioni studiile de ultrastructură au evidenţiat punţi internucleare de aproximativ 0,2 μm în diametru care par a fi precursori ai fuziunii nucleară complete. Nucleii interfazici formează heterocarioni la care stabilitatea nucleară poate să apară în timpul primei diviziuni mitotice, în situaţie în care s-au sincronizat diviziunile. Există cazuri cînd fusurile de diviziuni includ ambele seturi de cromozomi în interiorul unei membrane nucleară noi, dar unul din nuclei parcurge interfaza, iar celălalt este în plină mitoză. Cromozomii interfazici se contractă astfel precoce şi pentru că nu se pot ataşa la fus, ei se pierd uşor.

Heterocarionii pierd în mod obişnuit nuclei, cromozomi şi organite în special dacă presiunea selectivă este retrasă sau nici nu s-a aplicat. Unele fenomene sugerează că celulele eucariote posedă mecanisme de distrugere a ADN străin „non-self", asemănător cu sistemul enzimelor de restricţie de la bacterii.

Natura hibridă a produşilor de fuziune este evidentă numai după fuziunea nucleilor mitotici şi parcurgerea mai multor cicluri celulare. Acest fapt a fost observat la heterocarionii proveniţi din protoplaşti mai multor specii la plante.

Rezultatul fuziunii se poate constata şi în urma studiilor de ultrastructură a cloroplaştilor din protoplaştii foliari, respectiv a plastidelor caracteristice celulelor din cultură, precum şi a diferitelor tipuri de heterocromatină.

Uneori sînt reţinuţi cromozomii ambelor specii timp de mai multe luni de cultură, un exemplu fiind hibridul *Glycine max.* × *N. glauca.*

Selecţia hibrizilor somatici vegetali poate avea loc în diverse faze:

— imediat după fuziune înaintea apariţiei diviziunii;
— după diviziunea homo- şi heterocarionului;
— după apariţia calusului;
— după regenerarea de hibrizi somatici.

În fiecare din aceste faze se pot aplica metode diferite în funcţie de produşii de fuziune.

Fuziunea protoplaştilor de la diferite specii la care s-a obţinut diviziunea ulterioară a heterocarionilor

Mezofil foliar	Culturi celulare
1. *Hordeum vulgare*	× *Glycine max*
2. *Zea mays*	× *Glycine max*
3. *Pisum sativum*	× *Vicia hajastana*
4. *Pisum sativum*	× *Glycine max*
5. *Mellilotus alba*	× *Glycine max*
6. *Medicago sativa*	× *Glycine max*
7. *Caragana arborescens*	× *Glycine max*
8. *Brassica napus*	× *Glycine max*
9. *Hordeum vulgare*	× *Daucus carota*
10. *Nicotiana tabacum*	× *Glycine max*
11. *Nicotiana glauca*	× *Glycine max*
12. *Nicotiana rustica*	× *Glycine max*
13. *Colchicum autumnale*	× *Glycine max*

Urmărind la microscopul optic sau electronic structura şi ultrastructura la nivelul hibridului, în prima fază de homo- sau heterocarion se pot constata:

— cloroplaşti proveniţi din protoplaştii foliari, respectiv plastide caracteristice celulelor în cultură;

— diferite tipuri de heterocromatină *(Nicotiana tabacum* × *Glycine hispida)*;

— punţi internucleare.

Prezenţa sau absenţa unei entităţi citoplasmatice, leucoplaste sau cromoplaste, favorizează recunoaşterea trăsăturilor parentale.

În faza a doua se poate efectua cariotipul celulelor hibride. În cazul în care homo- sau heterocarionul a devenit sincarion, placa metafizică în timpul mitozei va cuprinde cromozomii speciilor parentale.

Kao (1977) a selecţionat linii celulare hibride de *N. glauca* × *Glycine hispida*, izolînd şi clonînd celulele hibride în mici sonde, îndepărtîndu-le astfel din competiţie cu celulele genitoare care cresc mai repede.

După apariţia calusurilor se pot folosi o serie de metode atît pentru identificarea hibrizilor, cît şi pentru selecţia lor, metode ce au la bază complementaritatea genelor.

Markerii biochimici în selecţia celulelor hibride O problemă importantă a geneticii celulei vegetale este reprezentată de selecţia şi caracterizarea liniilor celulare mutante. Mutantele rezistente la medicamente, ca şi auxotrofele nutriţionale nu pot constitui însă metode-standard de selecţie a hibrizilor somatici vegetali, aşa cum sînt la cei animali.

Au fost izolate linii celulare de *Nicotiana tabacum* rezistente la analogi ai aminoacizilor (aminocetil-L-cisteină, p-fluorofenilalanină, hidroxilizină, metionin-sulfoximină, s-metiltriptofan), la analogii purinelor şi ai pirimidinelor (bromdezoxiuridină, azoguanină), la NaCl, $KClO_3$, streptomicină şi treonină. Se folosesc, de asemenea, linii celulare rezistente la 8-azoguanină, acid 2,4-diclorofenoxiacetic, ca şi la temperaturi joase.

Rezistenţa endogenă la actinomicină D a fost combinată cu cerinţele nutriţionale ale fiecărei specii parentale, în selecţia hibrizilor somatici de *Petunia parodii* × *P. hibrida*. Schema selecţiei se bazează pe un răspuns

diferenţiat al creşterii protoplaştilor parentali pe mediul Murashige-Skoog conţinînd actinomicină D (Frearson şi colab., 1976; Izhar şi Power, 1977).

Mutantele albinotice sau sensibile la lumină ale speciilor la care se pot regenera plante din protoplaşti reprezintă alt sistem de selecţie a hibrizilor (Melchers şi Labib, 1974). Aceiaşi autori raportează obţinerea a 12 hibrizi somatici din numeroase calusuri testate de tutun, remarcînd complementaritatea mutantelor clorofiliene la nivelul calusului hibrid verde, diferit de calusurile galbene parentale. Selecţia, în acest caz, este eficientă după reducerea constituenţilor organici în mediu de 5 pînă la 10 ori. Într-un mediu cu un conţinut organic ridicat şi în lumină intensă hibrizii şi mutantele clorofiliene paterne devin verzi. Numai folosind auxotrofia în auxine a hibridului *N. glauca* × *N. langsdorfii* s-au putut realiza selecţia şi regenerarea plantelor hibride (fig. 41).

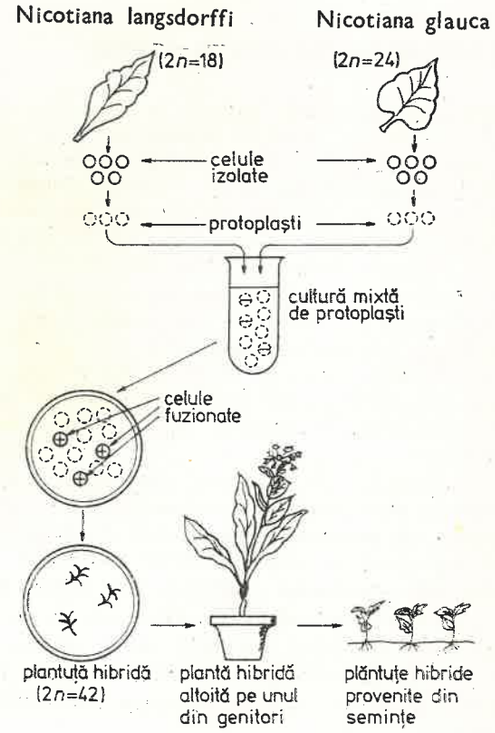


Fig. 41. — Hibridarea celulară între două specii de tutun: *N. langsdorffi* şi *N. glauca*. Deoarece plăntuţele hibride nu înrădăcinau ele au fost altoite pe unul dintre genitori.

Anumiţi agenţi patogeni sau toxinele lor provoacă o gamă largă de receptivitate la nivelul diferitelor familii de plante. De exemplu, toxinele provocate de *Helmintosporium maydis* rasa T distrug selectiv protoplaştii liniilor sensibile de porumb, în timp ce anumite linii se dovedesc rezistente. În fuziunea experimentală se pot selecţiona celule folosind linii celulare corespunzătoare. Un astfel de sistem reprezintă un potenţial valoros pentru practică: folosind linii rezistente la toxine se pot regenera plante imune la respectivul patogen.

Un rol în stabilirea naturii hibride a materialului vegetal îl au și trăsăturile morfologice, cele mai accesibile dealtfel, și care pot fi folosite în fiecare fază a dezvoltării hibridului de la heterocarioni la plante mature regenerate din calus. Mitchel (1937) a fuzionat celule de sfeclă roșie, care au vacuole pline cu antocian roșu, cu celule de ceapă, necolorate. Heterocarionii au fost identificați prin faptul că, la celulele fuzionate s-a observat diluarea pigmentului roșu de sfeclă cu sucul vacuolar necolorat de la ceapă.

În caracterizarea plantelor obținute prin regenerarea din calus hibrid, Carlson și colab. (1972) au folosit o serie de criterii care disting hibridul de speciile parentale: forma frunzelor, extinderea glabrității epidermale, ușurința de a forma tumori etc.

11.2. Hibridarea celulară la animale

Fuziunea celulară poate apărea *in vitro* sau *in vivo* fără adăugarea unor agenți de fuziune. Studiile ultrastructurale au pus în evidență fuziunea unor organite: lizozomi cu vacuole fagocitare, vezicule endoplasmice cu elemente ale aparatului Golgi, vezicule golgiene între ele pentru a forma placa celulară în timpul citokinezei, granulele secretorii cu membrana plasmatică în timpul eliberării lor etc. Cu excepția fecundației, foarte rar celulele normale fuzionează spontan *in vivo*.

Membranele celulare care fuzionează în timpul fecundării sînt înrudite structural cu cele care fuzionează intracelular. Așa, de exemplu, la multe specii, acrozomul, considerat derivat al aparatului Golgi, pătrunde prin membrana oului și ulterior fuzionează cu acesta, realizîndu-se o digestie enzimatică, care facilitează pătrunderea nucleului patern în citoplasma maternă. În general însă, fecundarea produce numai „hibrizi" intraspecifici.

La mamifere se cunosc și alte exemple de fuziune naturală care duc la formarea miotubulilor, a osteoclastelor, a celulelor gigante — anticorpi și însoțesc, de asemenea, fenomenele de implantare a embrionului în uter, Astfel, s-a observat formarea heterocarionilor în cazul șoarecilor alofenici prin testarea izozimelor și găsirea unor forme hibride de enzime.

În timpul dezvoltării embrionare, la scurt timp după implantare. peretele blastocistului prezintă două straturi celulare, dintre care cel exterior (sincițiotrofoblastul) conține celule fuzionate în direct contact cu epiteliul uterin. Acesta prezintă histocompatibilitate atît fetală, cît și maternă.

În condiții patologice s-a remarcat apariția celulelor gigante — policarioni — formate prin fuziunea macrofagelor. Formarea policarionilor este mediată de anumite virusuri ce provoacă, de exemplu: variola, varicela, vaccina, pojarul, oreionul, herpesul simplu și parainfluența. În tuberculoză apar policarioni cu peste 200 de nuclei denumiți „foreign-body giant cells" sau cînd acești nuclei se organizează la periferia celulei „Langharn's giant cells".

Alt tip de celule gigante sînt osteoclastele formate prin fuziunea osteocitelor, funcția lor fiind de resorbție în condiții normale în timpul creșterii și remanierii oaselor și de decalcifiere, în condiții patologice.

În cazul unor gemeni heterozigoți la bovine s-a observat existența unor himere eritrocitare. Dacă la naștere, gemenii prezentau ambele tipuri de celule roșii parentale, după un timp au apărut numai eritrocite hibride, care, probabil, s-au format prin fuziune celulară (Stone și colab., 1964).

Fuziunea celulelor normale sau patologice a fost pusă în evidență și *in vitro*. În culturile de mezenchim embrionar, ficat, endoteliu, ectoderm, endoderm, mușchi cardiac, epiteliu renal și celule macrofage epiteliale sau ectodermale apar destul de frecvent celule binucleate. Mioblastele tinere în cultură se orientează polar unele cu altele, formînd miotuburi; se pot obține și heterocarioni între mioblaste provenind de la specii diferite. Fuziunea lor și formarea miotuburilor depind de: faza ciclului celular în care se găsesc ambele categorii, faza G_1 fiind cea mai favorabilă; concentrația de ioni de Ca din mediul de cultură; vîrsta culturii, eficiența maximă apărînd între 8 și 13 zile de la inoculare.

În condiții patologice, în cultură s-a observat, încă din 1927, fuziunea spontană a celulelor din sarcomul de șobolan. Prin examinarea histologică a tumorilor s-au descoperit multe cazuri de celule polinucleate. S-a constatat că celulele tumorale pot fuziona cu celule normale *in vivo*, ceea ce duce la instabilitate cromozomială și la formarea de celule hibride care măresc variabilitatea genetică a populațiilor de celule tumorale.

În toate cazurile citate *in vivo* sau în culturi, fuziunea spontană apare destul de rar, frecvența sa variind între 10^{-2} și 10^{-6}.

Inducerea fuzionării celulare. Avînd în vedere frecvența redusă a fuziunii celulare spontane, în experiențele de hibridare somatică sînt utilizați factori de fuziune. Formarea policarionilor în culturi de celule și țesuturi poate fi provocată de diverse tipuri de virusuri. Dintre acestea, cele mai eficiente s-au dovedit paramixovirusurile. Andrewes și colab. (1955) au arătat că acestea au o anvelopă ce conține lipide și prezintă afinitate pentru membranele glicoproteice pe care le atacă enzimatic. În prezent se cunoaște o mare varietate de tipuri de celule susceptibile la atacul lor, fapt pentru care paramixovirusurile sînt folosite ca agenți-standard de fuziune.

Virusuri care induc fuziunea celulară:

Dezoxiribovirusuri (ADN)

— Virusuri herpetice: Varicela, Herpes simplex

— Virusuri pox: Rabbitpox

Ribovirusuri (ARN)

— Paramixovirusuri: Oreionul, Maladia Newcastle (NDV), Parainfluenza, v. Sendai (HVJ), SV_5, Pojarul, Virusul respirator sincițial

— Virusuri oncogene SRN: Sarcomul Rous, Visna

— Coronavirusuri: Virusul avian infecțios branhial

Cel mai utilizat este virusul Sendai, cunoscut și sub denumirile de *virus-influența 1*, *virus hemaglutinant* sau *virus japonez* (HVJ). El prezintă sau nu capacitate de hemoliză și fuziune, în funcție de tipul de celulă parazitată. Analizele histochimice au pus în evidență la nivelul anvelopei

lui o glicoproteină, cu o greutate moleculară variabilă în funcție de celula-gazdă parazitată; reducerea greutății ei la 53 000 daltoni este însoțită totdeauna de creșterea eficienței virusului.

Virusurile animale, în general, sînt fagocitate și pătrund în celula-gazdă incluse în vacuole. În cazul paramixovirusurilor, aceștia fuzionează cu plasmalema celulei-gazdă care, treptat, le înconjură formînd o vacuolă fagocitară, ce se desprinde și migrează în interiorul celulei. Fuziunea apare evidentă la microscopul electronic, aceasta debutînd prin dezorganizarea ambelor regiuni adiacente aparținînd membranei gazdă și celei virale. Frecvent, din membrana continuă dintre virus și gazdă se formează vezicule mici al căror înveliș aparține atît virusului, cît și gazdei (Morgan și Howe, 1968).

Fuziunea celulară mediată viral este influențată de mai mulți factori care țin atît de celula gazdă și de virusul implicat, cît și de condițiile de mediu cum sînt pH-ul, concentrația ionilor de Ca etc.

Caracteristicile celulei-gazdă. Specificitatea multor virusuri pentru gazdă se extinde și asupra diferitelor tipuri de celule. Acestea manifestă o *susceptibilitate* diferită de a fuziona pe cale virală. Specificitatea ține de natura chimică a situsurilor receptor de pe suprafața celulelor și, ca urmare, numai anumite virusuri reacționează cu anumite celule. Deoarece structura receptorilor este de natură glicoproteică celulele pot deveni insensibile prin digestie neuraminidazică. Virusurile „influenza", a căror anvelopă conține neuraminidază, deși provoacă aglutinarea celulelor, nu determină și fuziunea lor. Folosirea foarte răspîndită a virusurilor Sendai pentru inducerea fuziunii celulelor animale se datorează numărului mare de tipuri celulare stabilizate în cultură, care prezintă receptori specifici pentru aceasta. Capacitatea de fuzionare a celulelor este o indicație indirectă privind prezența receptorilor (fig. 42).

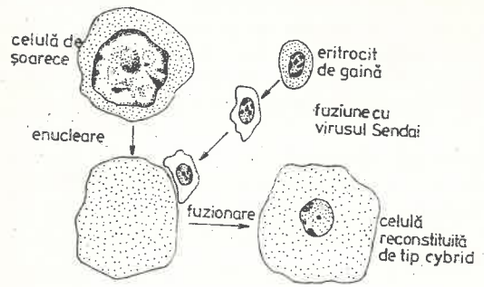


Fig. 42. — Hibridarea între o celulă de șoarece și un eritrocit de găină, cu ajutorul virusului Sendai. Se realizează transferul nucleului de la eritrocit în citoplasma celulei de șoarece, ai cărei cromozomi sînt eliminați, și se obține un tip special de hibrizi celulari denumit cybrid.

Primele experiențe privind formarea homocarionilor din leucocite folosind virusul Sendai (Okada și Tadokoro, 1963) au fost repetate și deci consacrate prin obținerea homo- și heterocarionilor și la alte tipuri de celule (Harris, 1965; Gordon și Cohn, 1970).

Condițiile de mediu sînt foarte importante în reușita fuzionării. Ca regulă, specificitatea riguroasă a gazdei și gradul de susceptibilitate pot fi modificate cu ajutorul condițiilor de mediu ce determină alterarea receptorilor celulari și a antireceptorilor virali. În condiții-standard se remarcă

o susceptibilitate mărită a celulelor maligne în raport cu cele normale, în culturi stabile, indiferent de pasaj.

Comportamentul celulelor în culturi mixte joacă un rol important în formarea și frecvența homo- și heterocarionilor. S-a stabilit că celulele din același histiotip tind să se găsească unele pe altele în timpul mișcării lor și să agrege în mod preferențial (Moscona, 1966). De exemplu, agregatele mioblastelor embrionare de pasăre se alipesc de mioblaste de șoarece, chiar dacă în cultură se găsesc și alte tipuri de celule de pasăre.

Capacitatea virusului Sendai de a induce fuziuni variază, de asemenea, cu fazele ciclului celular. Uneori nu s-a constatat vreo preferință privind participarea celulelor la fuziune în G_1, S sau G_2. Alteori, folosindu-se linii celulare leucemice de șoarece s-a remarcat o capacitate mai ridicată de fuziune celulară în faza G_2 tîrzie și în mitoză (Stadler și Adelberg, 1972). Aceste date corespund cu sinteza de glicoproteine și glicolipide, maximă în mitoză.

Factorii de fuziune. Deoarece virusurile „influenza" pot hemaglutina, dar nu lizează eritrocitele și nu sînt capabile nici de fuziune celulară, este natural să se sugereze că paramixovirusurile își datorează capacitatea de fuziune capacității lor de hemoliză. Din acest motiv s-a arătat că fuziunea nu este decît o liză controlată a celulelor aglutinate (Yanovsky și Loyter, 1972). Unele cercetări au arătat că în capacitatea de fuzionare a acestor virusuri intervine fie fracțiunea fosfolipidică a anvelopei virale, fie o componentă alterată prin degradarea fosfolipidelor.

Clar este faptul că, factorii de fuziune nu sînt legați de activitatea acidului nucleic viral. Okada și Tadokoro (1962) au arătat că infectivitatea virusului Sendai scade aproape de zero după un minut de expunere la ultraviolete, dar capacitatea lui de fuziune rămîne 100%. De aceea, prin inactivarea cu UV sau cu propiolactonă înainte de folosire, virusul Sendai rămîne doar un agent de fuziune celulară evitînd consecințele infecției.

Multiplicarea virusurilor. Numărul de particule virale este un factor important în fuziunea celulară. Kohn (1965) a calculat că numărul minim de particule virale per celulă necesar fuziunii și formării de policarioni în culturile monostratificate este de 150 de particule pentru virusul ce provoacă maladia Newcastle, în timp ce pentru celulele în suspensie este ceva mai mare. Okada și Murayana (1968) au arătat că pentru fuziunea celulelor ascitice Erlich în suspensie, rata virusurilor per celulă este de aproximativ 250. Paramixovirusurile necesită pentru inducerea fuziunii un număr de particule de 15—300 ori mai mare decît cel necesar pentru infecție.

Datele despre cantitatea de particule virale necesare fuziunii sînt importante cînd se lucrează cu agenți virali inactivați la care replicarea virală nu are loc, ca în experiențele cu particule infecțioase active. Acest tip de inducere a fuziunii prin virus inactiv a fost descris de către virusologi ca „fuziune din afară" (FFWO — „fusion from without") (Bratt și Gallaher, 1972).

Kohn (1965) a descris și alt tip de inducere a fuziunii care se datorează schimbărilor efective din membranele celulelor în timpul proceselor ce însoțesc reproducerea virusurilor în interiorul gazdei infestate, denumită

„fuziunea din interior" (FFWI „fusion from within"). Deoarece acest tip de fuziune este o consecinţă a reproducerii virale, numărul necesar de particule per celulă este egal cu cel cerut pentru infecţie.

În mod obişnuit însă, pentru obţinerea de celule hibride se folosesc paramixovirusurile inactivate, care reclamă o cantitate mai mare de virus.

În practică nu se pot calcula particulele virale per celulă, necesare în fiecare experienţă de fuziune. Se obişnuieşte să se exprime cantitatea necesară prin capacitatea de hemaglutinare per volum de suspensie virală. Astfel, în multe experienţe de hibridare în care se foloseşte virusul Sendai, cantitatea de virus este raportată în unităţi de hemaglutinare/mililitru (HAU — „hemaglutinating unit"). HAU reprezintă evaluări empirice derivate din capacitatea virusurilor în suspensie de a determina aglutinarea unei suspensii standard (circa 107 celule/ml) de eritrocite.

Concentraţia ionilor de calciu influenţează inducerea fuziunii celulare cu ajutorul virusurilor. Okada şi Murayama (1965 şi 1966) au arătat că ionii de calciu influenţează numai fuziunea, nu şi aglutinarea celulelor. Pentru a obţine o frecvenţă maximă de fuziune este necesară prezenţa a 0,42 mM Ca în mediul de cultură pentru mai mult de 10 minute de la începutul experienţei (Okada, 1969).

Reţetele obişnuite pentru inducerea fuziunii de către virusul Sendai reclamă mediile Hank sau Earle, ca soluţii de bază de săruri (BSS) în care concentraţia de calciu variază între 1,27 şi 1,8 mM $CaCl_2$ (tabelul nr. 38).

Tabelul nr. 38

Soluţia echilibrată de săruri (după Earle, 1943)

Constituenţi	Soluţia de săruri Earle (mg/l)	Soluţia de săruri Hanks (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	264,9	185,5
KCl	400,0	400,0
KH_2PO_4	—	60,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200,0	200,0
NaCl	6 800,0	8 000,0
$NaHCO_3$	2 200,0	350,0
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	158,3	—
Na_2HPO_4	—	47,50
Glucoză	1 000	1 000
Fenol roşu de Na	17,0	17,0

pH-ul mediului. Okada (1969) a arătat că fuziunea celulelor tumorale Erlich cu virus Sendai este dependentă de pH. Studii mai vechi dau un pH optim între 7,3 şi 7,8; Yanovsky şi Loyter (1972) precizează un pH între 7,8 şi 8,0. Diferenţa se explică prin faptul că anionii tampon ai pH-ului, fosfaţii şi carbonaţii, precipită ionii de calciu din mediu, ceea ce determină scăderea ratei de fuziune. Ulterior s-a folosit un tampon care este netoxic şi nu precipită ionii de calciu. S-a observat că folosind un pH ridicat şi o cantitate corespunzătoare de calciu se pot genera policarioni fără a mai folosi virusuri.

Procesele energetice. Pentru obţinerea unor rezultate optime este necesar ca în culturile de celule respiraţia aerobă să continue 5—10 minute în timpul fuziunii.

S-a observat că aglutinarea celulelor nu reclamă activitatea enzimatică. Cînd se foloseşte virusul Sendai, amestecul de celule + virus inactivat este ţinut la 4°C pentru o perioadă, timp în care respiraţia şi activitatea metabolică sînt încetinite. Creşterea treptată a temperaturii amestecului pînă la 37°C stimulează atît fuziunile celulare, cît şi activitatea neuraminidazei din anvelopa virală. Succesul fuziunii depinde de competiţia celor două fenomene, deoarece neuraminidaza distruge situsurile receptor, susceptibile pentru activitatea de aglutinare a virusului.

Agenţi nevirali care induc fuziunea celulară

Ionii de calciu. Prin incubarea protoplaştilor la 37°C şi adăugarea unei cantităţi de 40 pînă la 50 mM $CaCl_2$ se înregistrează o rată de fuziune ridicată.

Fuziunea eritrocitelor de pui se realizează prin incubarea întîi la 37°C şi pH ridicat (10,5), apoi răcire şi cu adaos de 40 mM $CaCl_2$ şi reîncălzire a culturilor.

Lizolecitina. Inducerea policarionilor se poate realiza şi prin aplicarea lipidelor sau a compuşilor lipidici celulelor mononucleate. Dintre acestea, mai frecvent se foloseşte lizolecitina în concentraţii mici de 10 — 100 μg/ml; în cantitate mai mare devine toxică pentru membranele celulelor vii. Citotoxicitatea poate fi redusă prin includerea de ser proteic, prin tratamentul cu albumină sau prin folosirea lizolecitinei în emulsie cu ser fetal de viţel.

Dintre substanţele lipoidice (acizii graşi, acidoalcooli graşi, derivaţii glicerolului) care au fost testate pentru capacitatea lor de fuziune s-au găsit eficiente: glicerolul monooleatul, ce măreşte rata de fuziune de 4—7 ori faţă de fuziunea spontană, lipidele mici veziculare şi fosfolipaza C.

Polietilenglicolul (PEG), folosit în metodele de inducere a fuziunii protoplaştilor, în 1974, poate fi folosit şi în culturile de celule animale.

11.2.1. Determinarea frecvenţei celulelor fuzionate

Deşi există o varietate de factori ce influenţează fuziunea cu ajutorul virusurilor şi care împiedică punerea la punct a unei metode-standard, se încearcă diverse formule pentru aprecierea gradului de fuziune.

În 1962, Okada şi Tadokoro au introdus termenul de index de fuziune (F.I. = „fusion index"), care treptat a fost adoptat şi modificat de alţi autori, uneori fiind exprimat procentual. Experimental, fuziunea produce în cantitate mai mare dicarioni în raport cu alte tipuri de policarioni. Cea mai simplă cale de a se aprecia fuziunea este exprimarea procentuală a numărului de policarioni în raport cu numărul total de celule. Această apreciere este suficientă dacă se urmăreşte definirea celor mai bune condiţii necesare producerii celui mai mare număr de heterocarioni de o

anumită dimensiune, dar se poate denatura numărul absolut de celule fuzionate, existînd eventualitatea unor extrafuziuni, cu apariția de tricarioni sau alte tipuri de policarioni.

O formulare originală pentru F.I. este cea care se referă la cultura de control ce poate fi o cultură experimentală înainte de adăugarea agentului de fuziune sau o cultură comparativă tratată ca una experimentală, cu excepția adăugării agentului de fuziune. Este preferabil controlul ulterior, pentru a lua în considerare pierderile de celule în timpul procedurilor sau multiplicarea lor pe durata experiențelor. Dezavantajul în această formulă este că nu se poate face distincție cînd anumite celule fuzionează într-un număr de policarioni mari și cînd mai multe celule fuzionează într-un număr mare de policarioni mici. De exemplu, dacă din 100 de celule originale 50 fuzionează într-un singur policarion, în timp ce 49 rămîn mononucleate, F.I. va fi egal cu 1. Dar F.I. este egal cu 1 dacă 100 de celule originale fuzionează în 50 de celule binucleate.

Avantajul F.I. este că determinarea lui reclamă numai recunoașterea și numărarea celulelor, chiar dacă primul termen (numărul de celule din cultura de control/numărul de celule din cultura experimentală) este de fapt echivalent cu numărul mediu de nuclei per celulă din cultura experimentală, iar al doilea termen este egal cu numărul mediu de nuclei per celulă în cultura de control.

Formula care exprimă cel mai bine numărul de nuclei în policarioni ca procent din numărul total de nuclei este:

$$\text{F.I.} = \frac{\text{numărul de nuclei din policarioni}}{\text{numărul de nuclei din toate celulele}} \times 100$$

11.2.2. Izolarea și selecția hibrizilor somatici

Formarea celulelor hibride mononucleate (sincarioni). Majoritatea celulelor hibride mononucleate sînt rezultatul diviziunii mitotice a heterocarionilor binucleați. Fuziunea nucleară care duce la formarea celulelor mononucleate s-a pus mai rar în evidență în cazul celulelor animale. Studiile de durată asupra policarionilor în cultură arată că nucleii își mențin individualitatea în interfază. În mitoză totuși, cromozomii din nuclei diferiți pot fi incluși într-un singur nucleu, desăvîrșindu-se fuziunea. Heterocarionii pot poseda centrioli supranumerari, care suferă diviziuni bipolare pentru a forma celule-fiice mononucleate. Astfel de hibrizi mononucleați continuă să se multiplice și prezintă mitoze regulate, bine balansate, ajungîndu-se la generații succesive de celule hibride (clone).

În multe cazuri însă, heterocarionii nu suferă diviziuni sau prezintă mitoze anormale. Astfel, în unele celule, cromozomii nu ajung niciodată în placa ecuatorială, în timp ce în altele, separarea cromozomilor în anafază este dezorganizată. Apar, de asemenea, diviziuni multipolare, datorită centriolilor supranumerari și formării mai multor fusuri. Puține celule hibride depășesc a doua diviziune și foarte rar pe a treia. Din aceste motive, rata efectivă de hibridare se calculează după numărul de clone hibride capabile să se multiplice timp îndelungat.

În general, în culturile monostratificate, eficiența hibridării este superioară culturilor în suspensie ce favorizează formarea heterocarionilor giganți.

Metode de izolare. Primele celule hibride au fost izolate pentru că ele proliferau mult mai rapid decît celulele parentale (Barski și colab., 1961). Acest fenomen datorat vigorii hibride nu este însă valabil pentru hibrizii care nu depășesc celulele parentale pe un mediu normal. În acest caz, celulele hibride se separă din amestecul de fuziune prin metode de izolare, neselective sau selective.

Izolarea neselectivă se poate realiza prin clonarea unei singure celule. Pentru aceasta, amestecul inițial de fuziune este distribuit într-un număr mare de vase, astfel încît o singură clonă să fie propagată în fiecare vas de cultură. Aceste clone se numesc „primare", în opoziție cu cele „secundare" ce se obțin prin subclonarea primelor. Clonele secundare pot fi folosite în analizele de variație genetică apărută în perioadele lungi de creștere a clonelor primare (fig. 43).

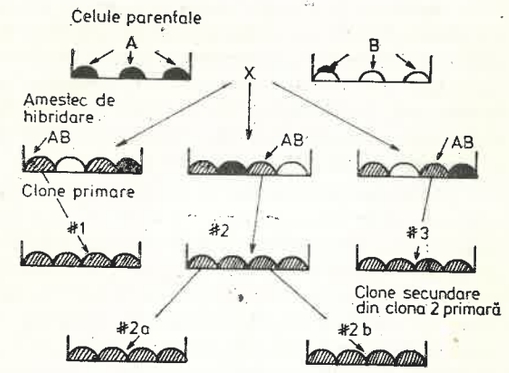


Fig. 43. — Schema izolării clonelor primare (1—3) din amestecul de hibridare, urmată de izolarea a două clone secundare (2a și 2b) prin subclonarea uneia dintre clonele primare (după Ringertz și Savage, 1976).

Dacă în cultura dată, proporția de celule hibride este mare, în raport cu numărul de celule parentale, pot fi izolate coloniile hibride prin selecția clonelor cu cariotip hibrid (Scaletta și Ephrussi, 1965). Pentru efectuarea analizelor cromozomiale, Ruddle și colab. (1970) au folosit, în cazul celulelor hibride de șoarece, metoda lui Moorhead (1960) ușor modificată:

— la patru ore după recoltarea celulelor se adaugă soluție de colcemid (CIBA) pînă ce cultura finală ajunge la concentrația de 1 mg/l ml;

— celulele sînt colectate în soluție hipotonică de tripsină și tratate cu soluție hipotonică de KCl (0,075 M);

— preparatele se fac prin metoda uscării la curent de aer;

— se colorează cu acetoorceină (1,5 g orceină la 100 ml acid acetic 65%).

În practică se iau în studiu numai acele colonii care diferă de celula parentală ca morfologie. Inconvenientul metodei constă în faptul că în astfel de cazuri se pot ignora celulele hibride al căror fenotip este asemănător cu unul din tipurile parentale.

Izolarea selectivă. În mod obișnuit, din experiențele de fuziune celulară rezultă un număr mic de celule hibride, care cresc încet și trebuie izolate dintr-un număr mare de celule parentale ce proliferează rapid.

Ca urmare s-au pus la punct medii selective, care favorizează creşterea celulelor hibride şi inhibă celulele parentale. Pe de altă parte, celulele foarte diferenţiate (celule nervoase, limfocite, spermatozoizi), care cresc încet sau deloc *in vitro*, formează hibrizi prolifici, cînd fuzionează cu celule mult mai active (celule tumorale, linii celulare stabilizate). Aceşti hibrizi pot fi izolaţi pe medii semiselective, în care selecţia este direcţionată numai prin proliferarea rapidă parentală (Davidson şi Ephrussi, 1965; Harris şi colab., 1969).

Selecţia nespecifică. Celulele animale provenind din diverse surse variază mult în ceea ce priveşte creşterea lor *in vitro*. Diferenţele se referă la optimum de temperatură, cerinţele nutriţionale şi capacitatea de creştere în suspensie, precum şi la adezivitatea şi preferinţa pentru mediul solid („dependenţa de ancorare"), sensibilitatea la inhibiţia de contact şi capacitatea de rezistenţă în cultură (senescenţă).

Deşi mecanismul molecular al acestor diferenţe este necunoscut ele pot fi folosite pentru izolarea celulelor hibride.

Selecţia hibrizilor după rezistenţa celulelor la medicamente, Szybalski şi colab. (1962) au demonstrat posibilitatea obţinerii şi selecţiei de celule mutante defective pentru anumite enzime specifice, prin tratarea unei populaţii de celule normale cu diverse medicamente. Pe baza acestor observaţii, Littlefield (1964, 1966) a pus la punct o metodă generală de izolare a celulelor hibride, folosind celule rezistente la azoguanină (AG^R) şi bromdezoxiuridină ($BUdR^R$).

Celulele rezistente la medicamente pot apărea spontan în culturi celulare, dar tratamentul cu raze X sau agenţi mutageni măreşte considerabil rata mutaţiilor. După expunerea la mutagen, în cultura testată se introduc azoguanina sau tioguanina, care omoară celulele normale, deoarece medicamentele sînt metabolizate şi interferează cu nucleotidele specifice în sinteza acizilor nucleici. Efectul este mediat de către hipoxantinguaninfosforibozil-transferază (HGPRT), care converteşte medicamentul în nucleotide anormale. Celulele mutante defective în enzima respectivă sînt rezistente la medicamente (AG^R sau TG^R) şi, ca urmare, supravieţuiesc.

Printr-un procedeu similar se obţin celule rezistente la bromdezoxiuridină ($BUdR^R$). În celulele normale, acest produs este mai întîi fosforilat prin timidinkinază (TK) şi ulterior încorporat în ADN, ceea ce duce la moartea celulelor. Mecanismul exact al distrugerii lor este incomplet cunoscut, dar apar mutaţii de tipul rupturilor cromozomiale care în mod cert afectează creşterea şi diferenţierea celulară. Celulele mutante (TK^-) nu pot efectua fosforilarea şi deci nu încorporează BUdR în ADN, ele devenind $BUdR^R$.

În sistemul selectiv pus la punct de Littlefield sînt izolate celule hibride rezultate din fuziunea celulelor AG^R (deci $HGPRT^-$) cu celule $BUdR^R$ (deci TK^-). Defectele genetice sînt de mică importanţă în timpul creşterii pe medii de cultură normale, deoarece aceste enzime sînt implicate numai în căile precursoare ale sintezei nucleotidelor. Dar, cînd sînt blocate căile principale de sinteză a purinelor şi pirimidinelor de către analogul acidului folic, aminopterina, celulele normale ($HGPRT^+$, TK^+) pot supravieţui numai dacă se adaugă în mediu hipoxantină şi timidină

exogenă, în timp ce celulele mutante mor din cauza incapacităţii de sinteză a nucleotidelor din hipoxantină (celule $HGPRT^-$) sau din timidină (celule TK^-) (fig. 44). Littlefield a demonstrat că celulele hibride formate prin

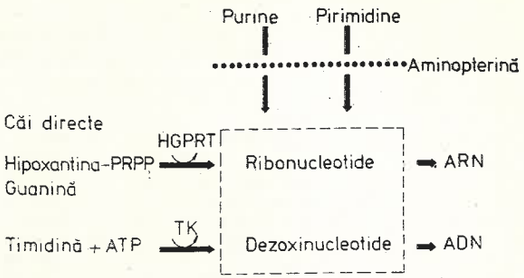


Fig. 44. — Căile biosintetice ale nucleotidelor. Pe mediul selectiv HAT, căile biosintetice principale sînt blocate de către analogul acidului folic, aminopterina. Celulele hibride supravieţuiesc, folosind hipoxantina şi timina, iar celulele mutante $HGRPT^-$ sau TK^- mor pe mediul selectiv (după Ringertz şi Savage, 1976).

fuziunea celulelor $HGPRT^-$ cu celule TK^- pot fi izolate pe un mediu ce conţine hipoxantină, aminopterină şi timidină, mediu denumit HAT (Szybalski şi colab., 1962). Acest mediu se suplimentează în mod obişnuit cu glicină, deoarece aminopterina blochează sinteza aminoacidului, făcînd celulele dependente de glicina exogenă.

În sistemul selectiv Littlefield, celulele hibride conţinînd un set de cromozomi $HGPRT^-$, dar TK^+, şi un set $HGPRT^+$, dar TK^-, sînt capabile să producă suficiente enzime HGPRT şi TK pentru a supravieţui pe mediul HAT, cele două genoame devenind complementare unul pentru celălalt.

Această tehnică de selecţie folosind metodele geneticii microbiene s-a dovedit extrem de utilă în fuziunea celulelor somatice eucariote, pentru obţinerea multor tipuri diferite de celule hibride. Ulterior s-au elaborat noi metode de selecţie bazate pe fuziunea celulelor rezistente la diverse medicamente.

Astfel, Kusano şi colab. (1971) au folosit celule $HGPRT^-$ şi celule deficitare în adeninfosforibozil-transferaza ($APRT^-$), celule obţinute după selecţia cu fluoroadenină.

Un sistem nou au folosit Chan şi colab. (1975), pornind de la mutante duble, deficiente în dezoxicitidinkinază (dCK^-) şi dezoxicitidindezaminază (dCD^-). Într-un mediu cu hipoxantină, aminopterină şi 5-metildezoxicitidină (mediu HAM), principalele căi biosintetice ale pirimidinei sînt blocate de aminopterină. Din acest motiv, celulele dCD^- sînt omorîte, în timp ce celulele dCD^+ supravieţuiesc, deoarece pot converti 5-metildezoxicitidina în timidină, care este apoi fosforilată la timidilat prin timidin-kinază (TK). Sistemul selectiv HAM este analog sistemului HAT, cu deosebire că 5-metildezoxicitidina înlocuieşte timidina în mediu, una din celule parentale fiind dCD^- în loc de TK^- (tabelul nr. 39).

Baker şi colab. (1974) au propus un nou sistem de selecţie ce prezintă avantajul folosirii unei singure celule parentale cu markeri de rezistenţă la medicamente; cînd una dintre celule, dublu mutantă, tioguaninrezistentă ($TG^R/HGPRT^-$) şi onobainrezistentă (On^R) fuzionează cu o celulă normală ($HGPRT^+/On^S$) rezultă hibrizi capabili să crească pe mediu HAT

Tabelul nr. 39

Mediu selectiv HAM conținînd hipoxantină, aminopterină și 5-metil-dezoxicitidină

Ingrediente	mg/l după Ham (1963)	mp/l după Ham (1965)
L-alanină	8,91	8,91
L-arginină-HCl	210,7	210,7
L-asparagină-H_2O	13,31	13,31
Acid L-aspartic	31,53	31,53
L-cisteină-HCl	14,71	14,71
Acidul L-glutamic	146,2	146,2
L-glutamină	7,51	7,51
Glicină	20,96	20,96
L-histidină-HCl·H_2O	2,62	3,94
L-izoleucină	13,12	13,12
L-leucină	29,30	36,53
L-lizină-HCl	4,48	4,48
L-metionină	4,96	4,96
L-fenilalanină	11,51	34,54
L-prolină	10,51	10,51
L-serină	3,57	11,91
L-treonină	0,61	2,04
L-triptofan	1,81	5,44
L-tirozină	3,51	11,72
L-valină	0,024	0,007
Biotină	0,715	0,238
D-pantotenat de calciu	0,698	13,96
Cholină chloridată	1,32	1,32
Acid folic	0,541	18,02
I-inozitol	0,611	0,037
Nicotinamidă	0,206	0,062
Piridoxil-HCl	0,376	0,038
Riboflavină	1,012	0,337
Tiamină-HCl	1,36	1,36
Vitamina B_{12}	44,10	44,10
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,0025	0,0025
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,8346	0,8346
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	285,0	223,7
KCl	152,7	147,9
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7 400	7 600
NaCl	156,2	142,0
Na_2HPO_4	1 200	1 176
$NaHCO_3$	0,0288	0,863
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 100	1 802
Glucoză	4,08	4,08
Hipoxantină	0,206	0,206
Acid lipoic	—	0,088
Linoleat metil	—	0,1611
Putrescină 2HCl	—	12,00
Fenol roșu de sodiu	12,0	110,0
Piruvat de sodiu	110,0	0,727
Timidină	0,727	—

ce conține onobaină, în timp ce celulele parentale mor. Rezistența hibrizilor se datorează fie deficienței în enzime specifice, fie unei rezistențe particulare, independentă de producția de enzime (tabelul nr. 40).

Tabelul nr. 40

Tipuri de mutante celulare rezistente la medicamente (după Cell Hybrids, 1978)

Medicamente	Linii celulare rezistente
— Azoguanină (AG)	Deficiență în hipoxantin-guaninfosfori-boziltransferază ($HGPRT^-$)
— Tioguanină (TG)	
— Fluoroadenină	Deficiență în adeniu fosforibozil-transferază ($APRT^-$)
— 5-bromodezoxiuridină (BUdR)	Deficiență în timidinkinază (TK^-)
— Citozinarabinozidă (ara—C)	Deficiență în dezoxicitidinkinază (dCK^-)
— 5-bromodezoxicitidină	Deficiență în dezoxicitidindezaminază (dCD^-)
— α-amanitină	Deficiență în ARN-polimerază II (nucleoplasmic)
— Aminopterină	Deficiență de tetrahidrofolat-reductază
— Onobaină	Rezistență la ATP-ază activată Na^+K^+
— Colchicină	Bariera de permeabilitate

Selecția hibrizilor folosind mutante auxotrofe. Tehnica de selecție a celulelor care reclamă elemente speciale nutritive în mediu (auxotrofe), mutante produse din celule normale (prototrofe), a fost dezvoltată inițial la bacterii. Recent au fost aplicate metode similare la celule eucariote, metode care s-au dovedit foarte eficiente în experiențele de hibridare. Au fost izolate diverse mutante, care reclamă aminoacizi, hidrați de carbon, purine și pirimidine în mediul de cultură. După Cell Hybrids (1976) se dau unele mutante auxotrofe: Glutamină — Glu^-, Serină — Ser^-, Prolină — Pro^-, Glicină — Gly^-, Adenină — Ade^-, Inozitol — Ino^-.

Pentru selecția acestor mutante, Puck și Kao (1967) propun o tehnică după care celulele normale sînt forțate să crească pe un mediu minimal din care s-a exclus un anumit aminoacid, pe care celulele normale proliferează rapid, iar mutantele își încetinesc creșterea. Ulterior, cultura se suplimentează cu BUdR care se încorporează în ADN-ul celulelor ce proliferează rapid. După iradierea cu UV, celulele care au încorporat BUdR prezintă rupturi cromozomiale cărora nu le supraviețuiesc. În schimb, celulele mutante care nu au încorporat BUdR rămîn în cultură, de unde pot fi trecute pe mediul suplimentat cu aminoacidul exclus din prima variantă (fig. 45).

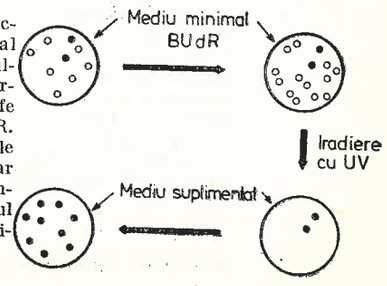


Fig. 45. — Selecția mutantelor auxotrofe care se efectuează prin creșterea celulelor pe un mediu minimal din care s-a exclus un element specific. În timpul multiplicării, celulele de tip sălbatic (cercuri pline) încorporează BUdR în ADN, în timp ce celulele auxotrofe (cercuri goale) nu cresc, deci nu încorporează BUdR. Cînd cultura este iradiată cu UV, celulele normale sînt omorîte prin efectul fotosintetizat al BUdR, iar auxotrofele supraviețuiesc. Mediul minimal este înlocuit apoi cu un mediu suplimentat cu aminoacidul reclamat de celulele auxotrofe și care se vor multiplica ulterior (după Ringertz și Savage, 1976).

O alternativă a acestei metode foloseşte timidina radioactivă pentru a omorî celulele care sintetizează ADN (Siminovitch, 1974).

Folosirea mutantelor auxotrofe ca celule parentale favorizează, în experienţele de fuziune, izolarea hibrizilor celulari. De exemplu, dacă se folosesc mutante auxotrofe, una deficitară în glicină, iar cealaltă în prolină, prin intermediul complementarităţii genelor, hibrizii vor fi capabili să crească pe un mediu minimal din care s-au exclus aminoacizii amintiţi. Uneori, două linii celulare ce reclamă aceeaşi substanţă diferă în privinţa mutaţiilor genice, care afectează fie două enzime separate, din aceeaşi cale metabolică, fie două lanţuri polipeptidice ale aceleiaşi enzime. Prin fuziunea acestor linii vor rezulta hibrizi care, de asemenea, sînt prototrofici.

Folosirea mutantelor sensibile la temperatură. Culturile de celule animale reclamă o temperatură între 32° şi 40°C, optima fiind de 37°C. Ca şi în cazul mutantelor auxotrofe, se pot izola mutante sensibile la temperatură (Ts), care sînt incapabile să crească la 38—39°C („nonpermisive temperature"), dar cresc la fel ca cele normale la 33—34°C („permissive temperature").

Pentru a izola mutante Ts, celulele din cultură sînt expuse mai întîi la agentul mutagen la temperatura obişnuită (33—34°C). După ce se îndepărtează mutagenul, celulele se lasă un timp pe acelaşi mediu pentru a descoperi mutantele, apoi culturile se schimbă la aproximativ 37°C, la care celulele normale se dezvoltă, iar cele mutante stagnează. După exprimarea fenotipurilor mutante, se adaugă un agent selectiv (BUdR sau timidină tritiată) pentru a omorî toate celulele capabile să crească la temperatura „nonpermissive". Se revine apoi la temperatura „permissive", care permite celulelor mutante să se multiplice. Se presupune că schimbările de temperatură provoacă modificări conformaţionale ale ARN şi proteinelor, avînd drept consecinţă inactivarea şi denaturarea lor.

Tabelul nr. 41

Celule umane mutante care pot fi utilizate în hibridarea celulară somatică

Sindroame	Molecule afectate
— Arginosuccinicacidurie	Arginosuccinază
— Citrulinemie	Arginosuccinat-sintetază
— GM_1 gangliozidază — tip I	Absenţa β-galactozidazei A, B şi C
— GM_1 gangliozidaza — tip II	Absenţa β-galactozidazei B şi C
— GM_2 gangliozidaza — tip I (maladia Tay-Sachs)	Absenţa hexozaminidazei A
— GM_2 gangliozidaza — tip II (maladia Sandhoff)	Absenţa hexozaminidazei A şi B
— Deficienţă G 6 PD	Glucozo-6-fosfat-dehidrogenază
— Galactozemie	4-DP-galactozo-transferază
— Maladia Gaucher	Glucocerebrozidază
— Sindromul Hunter	α-L-iduronidază
— Sindromul Hurler	Sulfiduronat-sulfatază
— Diabet insipid	Lanţul cetoacid al decarboxilazei
— Leucodistrofia metacromatică	Arilsulfataza A
— Sindromul Lesch-Nyhan	Hipoxantin-guanin-fosforibozil-transferază
— Oroticacidurie	Orotidin - 5′-fosfat-pirofosforilază şi orotidin-5-fosfat-decarboxilază
— Xeroderma pigmentosum	Enzimele de replicaţie a ADN

Se pot obţine hibrizi celulari atît între diferite mutante Ts, cît şi prin încrucişarea lor cu mutante auxotrofe sau cu celule rezistente la medicamente. Deoarece hibrizii obţinuţi în celule parentale Ts pot creşte la temperaturi „nonpermissive", se înţelege că mutantele respective prezintă leziuni genetice, ce provoacă defecte biochimice la nivelul hibridului.

Selecţia hibrizilor folosind celule mutante umane. Se cunosc deja un număr mare de erori înnăscute de metabolism ce au fost puse în evidenţă şi în culturi celulare. Mutantele respective se pot izola *in vitro* pe medii selective ce omoară celulele normale (tabelul nr. 41). Liniile celulare umane mutante pot folosi, de asemenea, în experienţele de fuziune la izolarea hibrizilor. Aşa, de exemplu, celule izolate din sindromul Lesch-Nyhan, care sînt $HGPRT^-$ şi pot creşte deci pe mediu cu 8-azoguanină sau tioguanină, încrucişate cu celule TK^- formează hibrizi capabili să crească în sistemul selectiv HAT (Migeon şi Miller, 1968; Croce şi Koprowski, 1974).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

AHKONG Q. F., FISHER D., TOMPION W., LUCY Y. A., 1975, Nature (Lond.), *253*, 194—195.

AHLOOWALIA B. S., 1966, Genetica, **54**, *1*, 2.

ANDREWES C. H., BONG F. B., BURNET F. M., 1955, Virology, *1*, 176—184.

ANGHEL I., 1975, *Pepeni fără semințe*, Universitatea București.

ANGHEL I., 1979, *Citologie vegetală*, Edit. didactică și pedagogică, București.

ANGHEL I., IGNAT G., 1974, *Poliploidia în ameliorarea plantelor*, Universitatea București.

ARAKAKI D. T., SPARKES R. S., 1963, Cytogenetics, *2*, 57.

ARRIGHI E., HSU T. C., 1971, Cytogenetics, *10*, 81—86.

ARSENIEVA M. A., TIMJAKOV G. G., 1960, *Report to UN Scientific Comittee on the effects of Atomic Radiation*.

ASTAUROV B. L., 1959, Symp. Genet. et Biol. Italica, *9*, 1—20.

ASTAUROV B. L., 1965, *Poliploidia i selectia*, Izd. Nauka, Moscova, Leningrad.

BAKER R. M., BRUNETTE D. M., MANKOVITZ R., THOMPSON L. M., WHITMORE G. E., SIMINOVITCH L., TILL J. E., 1974, Cell, *1*, 9—21.

BARSKI G., SORIEUL S., CORNEFERT F., 1960, C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., *251*, 1 825—1 827.

BARANOVSKAYA L. T., 1972, Ann. Genet., *15*, 271—274.

BASUR P. K., 1963, Exp. Cell. Res., *30*, 299.

BEÇAK M. L., BEÇAK R., RABELIO C., 1966, Chromosoma, *19*, 188—194.

BELL S., WOLFF S., 1964, Proc. Natl. Acad. Sci., *51*, 195.

BENEA V., LEANDRU L., POPA A., DUMITRESCU ANCA, 1965, în *Cercetări de genetică*, Edit. didactică și pedagogică, București, p. 417—424.

BENNETT M. D., CHAPMAN V., RILEY R., 1971, Proc. Roy. Soc. Lond., B, *178*, 259—275.

BENNETT M. D., FINCH R. A., SMITH J. B., RAO M. K., 1973, Proc. Roy. Soc. Lond., B, *193*, 301—319.

BENNETT M. D., GUSTAFSSON J. P., SMITH J. B., 1977, Chromosoma, **61**, *2*, 149—176.

BENNETT M. D., JELLINGS A. J., 1975, Heredity, **25**, *2*, 261—272.

BENNETT M. D., SMITH J. B., 1976, Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., **247**, 227—247.

BIANCHI N., LIMA-DE-FARIA A., JAWORSKA H., 1964, Hereditas, **51**, 207—211.

BOLLUM F. J., 1959, J. Biol. Chem., *234*, 2 733.

BOOTSMO D., 1974, *Somatic Cell Hibridation* (R. L. Davidson) F. F. Sc. Co. Cruz, eds., Raven, New York, p. 265—269.

BRAGDÖ M., 1955, Euphitica, *4*, 76—82.

BRATT M. A., GALLAHER W. R., 1972, În *Membrane Research*, C. F. Fox, p. 383—406.

BREMER-REINDERS D. E., BREMER G., 1952, Euphytica, *3*, 49—63.

BRIDGES C. B., BREHME K. S., 1944, *The mutants of Drosophila melanogaster*, Carnegie Institutional of Washington Publication, p. 552.

BUIATTI M., RONCHI V. N., 1963, Caryologia, *16*, 397—403.

BURGESS Y., FLEMING E., 1974, Planta (Berl.), *118*, 183—193.

BUTENKO R. G., 1968, *Israel Program for Scientific Translations*, Ierusalem.

CARLENIUS C., RYTTMAN H., TEGELSTRÖM H., JANSSON H., 1981, Hereditas, **94**, 61—66.

CARR D. H., WALKER J. E., 1961, Stain Technol., *36*, 233—236.

CARLSON P. S., SMITH M. M., DEARING R. D., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., *69*, 2 292—2 294.

CASPERSSON T., 1958, în *General Cytochemical Methods*, vol. I, Danielli F. J., New York.

CASPERSSON T., 1969, Exp. Cell. Res., *60*, 315—319.

CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G. E., KUDYNOWSKI J., MODEST E. J., SIMONSSON E., WAGH U., ZECH L., 1968, Exp. Cell. Res., *49*, 219—222.

CASPERSSON T., ZECH L., MODEST E. J., FOLEY G. E., WAGH U., SIMONSSON E., 1969, Exp. Cell. Res., *58*, 128—140.

CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., 1970, Exp. Cell. Res., *60*, 315—319.

CHAN T., LONG C., GREEN H., 1975, Somatic Cell Genet., 81—90.

CHEN T. R., 1970, Fish. Res. Canada, *27*, 158.

* * * *Chromosome methodologies in mutation testing. Toxicology and applied pharmacology*, 1972, *22*, 269—275.

CHU E. H. Y., MALLING H. V., 1968, Proc. Natl. Acad. Sci. S.U.A., *61*, 1 306.

CILIEVICI O., OPRIȘAN A., 1972, *Genetica*, SSB, București, p. 109—117.

COCKING E. C., 1970, Int. Rev. Cytol., *28*, 89—124.

COMINGS D. E., KOVACS B. W., AVELINO E., HARRIS D. C., 1975, Chromosoma, *50*, 111.

* * * *Committee on Standardized genetic nomenclature for mice 1972. Standard karyotype of the mouse, Mus musculus*, J. Hered., *63*, 69—72.

CONGER A. D., FAIRCHAILD L. M., 1953, Stain Technol., *28*, 281—283.

CONSTABEL F., 1975, În *Plant tissue culture methods*, Gamborg O. L., Wetter L. R. (eds.), National Research Council of Canada, Ottawa, p. 11—22.

CONSTABEL F., DUELITS D., GAMBORG O. L., KAO K. N., 1975, Can. J. Bot., *53*, 2 092—2 095.

CONSTABEL F., WEBER G., KIRKPATRICK J. W., PAHL K., 1976, Z. Pflanzenphysiol., *79*, 1—7.

COUTTS R. H. A., WOOD K. R., 1975, Plant Sci. Lett., *4*, 189—193.

CROCE C. M., KOPROWSKI H., J. Exp. Med., *140*, 1 221—1 229.

DALLAI R., TALLURI M. V., 1969, Chromosoma, *27*, 86—94.

DARLINGTON C. D., LA COUR L. F., 1976, *The handling of chromosomes*, George Allen & Unwin Ltd. Londra, p. 112—121.

DARVEY N. L., GUSTAFSON J. P., 1975, Crop. Sci., *15*, 239—243.

DAVIDSON R. L., EPHRUSSI B., YAMAMOTO K., 1966, Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., *56*, 1 437—1 440.

DAVIS B. D., 1950, Experientia, *6*, 41.

DEMEREC M., KAUFMANN B. P., 1962, *Drosophila guide. Introduction to the Genetics and cytology of Drosophila melanogaster*, Carnegie Institution of Washington, p. 1—47.

DERMEN H., 1954, J. Heredity, *45*, 159—172.

DIACONU P., BANU M., 1969, în *Cercetări de genetică*, Edit. didactică și pedagogică, București, p. 300—305.

DÖBEL P., RIGOMER R., MICHAELIS A., 1973, Chromosoma, *43*, 409—422.

DRAKE J., 1970, *The molecular basis of mutation*, Dolden-Day, San Francisco, Londra.

DRETS M. E., SHAW M. W., 1971, Proc. Natl. Acad. Sci. S.U.A., *68*, 2 073—2 077.

DUDITS D., KAO K. N., CONSTABEL F., GAMBORG O. L., 1976, Can. J. Genet. Cytol., *18*, 263—269.

DUMA D., 1972, *Genetica*, SSB, București, p. 71—75.

DUMAS DE VAULX R., 1970, Ann. Amelior. Plantes, **20**, *3*, 375—378.

DUPRAW E. J., 1970, *DNA and chromosomes*, Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York.

DUTRILLAUX B., 1973, Chromosoma (Berl.), *41*, 395—402.

DUTRILLAUX B., LEJEUNE J., 1971, C. R. Acad. Sci., Paris, *272*, 2 638—2 640.

EDWARDS R. G., 1965, Lancet, II, 926—929.

EIBERG H., 1974, Nature, *248*, 55.

ELLIOT F. C., 1958, *Plant Breeding and Cytogenetics*, McGraw Hill Book Comp. Inc., New York, Toronto, Londra.

ENDO A., INGALLS T. H., 1968, Hereditas, *59*, 832—841.

ENZMANN-BECKER G., 1973, Z. Naturforsch., *28*, 470—471.

EPHRUSSI B., WEISS M. C., 1965, Proc. Natl. Acad. Sci. S.U.A., *53*, 1 040—1 042.

EPSTEIN S. S., BASS W., ARNOLD E., BISHP Y., 1970, Science, *168*, 584.

ERICKSSON T., 1966, Physiol. plant., **19**, 900.

ESSAD S., 1960, Ann. amelior. plantes, *2*, 199—226.

ESSAD S., TOUVIN H., 1959, Ann. amelior. plantes, *4*, 553—574.

EVANS H. J., SCOTT D., 1969, Proc. Roy. Soc. Lond., Series B, *173*, 491.

EVANS P. K., BERRY S. E., BANKS M., SAFWAT S., 1974, În *The use of Protoplasts from fungi and Higher Plants as genetics Systems*, University of Nottingham, p. 26—31.

FANKHAUSER G., HUMPHREY R. R., 1959, J. Exp. Zool., *142*, 379—422.

FAUST J., VOGEL W., 1974, Nature, *249*, 352—353.

FERRARY R., 1959, Ann. amelior. plantes, *3*, 403—420.
FEULGEN R., ROSSENBECK A., 1924, Zeitschr. f. physiol chem., *135*, 203—248.
FISKESJÖ G., 1981, Hereditas, **95**, 155—162.
FISKESJÖ G., 1982. *Evaluation of short-term tests for toxicity and mutagenity with special reference to mercury and selenium*, Institute of Genetics, University of Lund, Suedia.
FORD C. E., HAMERTON J. L., 1956, Stain Technol., *31*, 247—251.
FOWKE L. C., BECH-HONSEN C. W., GOMBORG O. L., CONSTABEL F., 1975, J. Cell. Sci., *18*, 491—507.
FRACCARO M., 1960, Ann. hum. Genet., *24*, 45.
FREARSON E. M., POWER Y. B., COCKING E. C., 1973, Developmental Biology, *33*, 130—137.
FREDGA K., 1968, Chromosoma, *25*, 75—89.
FRISH B., NAGL W., 1979, Plant Systematics and Evolution, *131*, 261—276.
FROLAND A., 1961, Acta Parhol. Microbiol. Scand., **53**, *3*, 319.
FUNAKI K., MATSUI S., SASAKI M., 1975, Chromosoma, *49*, 357—370.
GAMBORG O. L., CONSTABEL F., FOWKE L. C., KAO K. N., OHYAMA K., KARTHA K. K., PELCHER L. E., 1974, Can. J. Gen. Genet. Cytol., *16*, 733—750.
GAMBORG O. L., SHYLUR J., KARTHA K. K., 1975, Plant. Sci. Lett., *4*, 285—292.
GARY FILION W., 1974, Chromosoma, *49*, 51—60.
GAUTHERET R. J., 1959, În *La culture des tissus vegetaux*, Masson and Cie, Paris.
GEAR J. R., SPENCER I. D., 1963, Can. J. Chem., *41*, 783—803.
GIANELLI E., 1970, *Monographs in Human Genetics*, 5, Karger, Basel.
GILLES A., DEVEREUX M., LHOAS P., 1956, Genetica, *28*, 42—50.
GIOSAN N., NICOLAE I., 1970, *Probleme de genetică teoretică și aplicată*, II, 5.
GLIMELIUS K., WALLIN A., ERIKSSON T., 1974, Physiol. Plantarum, *31*, 225—230.
GORDON S., COHN Z., 1970, J. Exp. Med., *131*, 981—1 003.
GRAY C., 1971, J. Pediatr., *79*, 119—122.
GREILHUBER I., 1979, Pl. Syst. Evol., *131*, 243—259.
GRÖBER K., 1959, *Mutationsversuche in kulturpflanzen*. XI. *Die Erzengung von somatischen Mutationen mit Röntgenstrahlen*, Die Kulturpflanzen, Berlin.
GUHA S., MAHESHWARI S. C., 1964, Nature, *204*, 497—500.
GUPTA P. K., 1974, Chromosoma (Berl.), *54*, 155—164.
HIDLACZKY GY., KALMAN L., 1975, Heredity, **35**, *3*, 371—374.
HAGBERG A., 1952, Hereditas, *38*, 221—245.
HAM R. G., 1965, Proc. Nat. Sci., *53*, 288.
HARNDEN D. G., 1960, Exp. Pathol., *41*, 31—37.
HARRIS H., KLEIN G., 1969, Nature (Lond.), *224*, 1 315—1 316.
HARTMANN Y. X., KAO K. N., GOMBORG G. L., MILLER R. A., 1973, Planta (Berl.), *112*, 45—56.
HEDDLE J. A., 1973, Mutation Res., **18**, *2*, 187—190.
HELLER R., 1953, Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg., Paris, *14*, 1—223.
HESLOT H., 1960, Genetica Agraria, **XIII**, *1—2*, 79—112.
HOFFMAN W., ZOSCHKE U., 1955, Der züchter, **25**, *7/9*, 119—206.
HOWARD A., PELC S. R., 1953, Heredity, *6*, Suppl., 261—273.
HSU T. C., 1979, *Human and Mammalian Cytogenetics, An Historical Perspective*, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.
HUANG C. C., CLARK M., GANS E., 1967, Chromosoma, *22*, 1—15.
HUGHES D. T., 1966, Chromosomes Today, *1*, 138—210.
HUGO DE VRIES, 1909, *The mutation Theory Experiments and Observations on the Origin of Species in The vegetable kingdom*, Open Court Publ. Co., Chicago.
HUNGERFORD D. A., 1971, Cytogenetica, *10*, 23—32.
HYDE B. B., GARDELLA C.A., 1953, Stain Techn., *28*, 305—308.
IMSHENETSKY A., SOLNZEVA L. I., KURANOVA N. F., 1966, Allgem. J. Microbiologie, **V**, *1*, 1—9.
IWATA J., 1940, Jap. J. Bot., *10*, 375—382.
KANAI R., EDWARDS G. E., 1973, Plant Physiol., *52*, 484—490.
KAO K. N., GAMBORG O. L., MICHAYLUK M. R., KELLER W. A., MILLER R. A., 1973, C.N.R.S., *212*, 207—213.
KASPERBAUER M. J., COLLINS G. B., 1972, Crop. Science, *12*, 98—101.
KAWANO S., 1965, Bot. Magazine, Tokyo, **78**, *919*, 36—42.
KELLER W. A., MELCHERS G., 1973, Zeitschrift für Naturforschung, *28*, 737—741.
KENNEDY J. F., DONAHUE R. P., 1969, Science, *164*, 1 292—1 293.

KIHLMAN B. A., 1966, *Actions of Chemicals on dividing cells*, Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
KIHLMAN B. A., DZINTRA KRONBORG, 1975, Chromosoma (Berl.), *51*, 1—10.
KIHLMAN B. A., NATARAJAN A. T., ANDERSSON H. C., 1978, Mutation Res., *52*, 181—198.
KING R. C., 1975, *Handbook of Genetics. Vertebrates of Genetic interest*, vol. 4, cap. 9, Plenum Press, New York, Londra.
KLASTERSKA I., NATARAJAN A. T., RAMEL C., 1976, Hereditas, *83*, 103—214.
KLINGER H. P., LUDWIG K. S., 1957, Stain Technol., *32*, 235—244.
KOBEL H. R., 1962, Experientia, *18*, 173—174.
KOFMAN-ALFARO S., ANN C. CHANDLEY, 1970, Chromosoma, *31*, 404—420.
KOHN A., 1965, Virology, *26*, 228—248.
KONGSUWAN K., SMITH D. R., 1977, Chromosoma, *60*, 169—178.
KOO K. N., 1976, *Plant tissue culture methods*, Canada, p. 22—27.
KOPROWSKI H., JONSEN F. C., STEPLEWSKI Z., 1967, Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., *58*, 127—133.
KUSANO T., LONG C., GREEN H., 1971, Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., *68*, 82—86.
LABAT R., 1967, C.R. Acad. Sci. Paris, *264*, 2 473.
LA COUR L. F., 1954, Laboratory Practice, *3*, 326—330.
LAJTHA L. G., 1952, J. Clin Path., *5*, 67.
LAMM R., 1981, Hereditas, **94**, 45—52.
LARKIN P. J., 1976, Planta, *128*, 213—216.
LATT S. A., 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. Wash., *70*, 3 395—3 399.
LAVAPPA K. S., FU M. M., SINGH M., BEYER D. R., EPSTEIN S.S., 1973, Laboratory Animal Science, **23**, *4*, 546—550.
LEDERBERG S., LEDERBERG E. M., 1952, J. Bact., *63*, 399.
LELAKIS P., 1957, Annales de l'Ecole nationale d'Agriculture de Montpelier, **XXX**, 1—2.
LEUCHTENBERGER C., 1958, *Quantitative determination of DNA in cells by Feulgen microspectrophotometry in General Cytochemical Methods* (ed. J. F. Fanielli), New York.
LEVAN G., 1974, Hereditas, *77*, 37—52.
LEVAN A., FREDGA K., SANDBERG A., 1964, Hereditas, *52*, 201—220.
LIMA-DE-FARIA A., 1959, J. Biophys. Biochem. Cytol., *6*, 457—466.
LIMA-DE-FARIA A., 1965, Hereditas, *53*, 1—18.
LIMA-DE-FARIA A., DUALITS D., RASKO I., HADLACZKY GY., 1976, Hereditas, *82*, 121—124.
LISGAR F., GERTNER M., CHERRY S., HSU L. Y., HIRSCHHORN L., 1970, Nature, *225*, 280—281.
LISON L., 1960, *Hystochimie et cytochimie animales. Principes et methodes*, Gauthier-Villars, Imprimeur Libraire, Paris.
LITTLEFIELD Y. W., 1966, Exp. Cell. Res., *41*, 190—196.
LOPEZ-SÁEZ J. F., GIMENEZ-MARTIN G., GONZALES-FERNANDEZ A., 1966, Z. Zellforsch., *75*, 591.
LUCY Y. A., 1970, Nature (Lond.), *227*, 815—817.
LURIA S. E., DELBRÜCK M., 1943, Genetics, *28*, 491—511.
MACKEY J., 1962, *Symposium of Genetics and Wheat Breeding*, Martonvasar, Hungary, 1, 203—220.
MARGARA I., TOUVIN H., 1958, C. R. Acad. Agric., *44*, 172—176.
MARKS G. E., 1977, Chromosoma, **62**, *4*, 370—372.
MATAGNE R., 1968, Caryologia, *21*, 209.
MATSUURA H., TANIFUGI S., SAHO T., IWABUCHI M., TAKIZAWA S., 1962, J. Fac. Sci., Hokkaido Univ. seria V, *8*, 201.
MATSUI S., 1974, Japan J. Genet., *49*, 93—96.
MAXIMILIAN C., IONESCU B., 1978, *Citogenetică medicală umană*, Edit. Academiei, București.
MAZIA D., 1974, Scientific American, *1*, 55—64.
MCPHAILL J. D., JONES R. L., 1966, J. Fish. Res., **23**, *5*.
MCKEY J., 1954, Hereditas, *40*, 65—180.
MELCHERS G., LABIB G., 1974, Mol. Gen. Genet., *135*, 277—294.
MELLMAN W. J., 1965 În *Human Chromosome Methodology*, ed. J. J. Yunis, Academic Press, New York, Londra.
MEREDITH R., 1969, Chromosoma, *26*, 254—258.
MERKER A., 1973, Hereditas, *75*, 2.

MEYER Y., 1974, Protoplasma, *81*, 363—372.
MICHAYLUK M. R., KAO K. N., 1974, Planta Berl., *115*, 355—367.
MIGEON B. R., MILLER C. S., 1968, Science, *162*, 1 005—1 006.
MIHĂILESCU A., RAICU P., 1969, în *Cercetări de genetică*, Edit. didactică și pedagogică, București, p. 132—142.
MILLER O. Y., ALLDERDICE P. W., MILLER D. A., BREG W. R., MIGEON B. R., 1971, Science, *173*, 244—245.
MIRSKY A. E., RIS H., 1951, J. Gen. Physiol., *34*, 475.
MITTWOCH U., 1967, Cytogenetics, *6*, 38—50.
MOCCIZUKI A., SUEOKA N., 1955, Citologia, *10*, 358—366.
MOLÉ-BAYER J., 1958, Chromosoma, *9*, 332.
MOORE K. L., BARR M. L., 1955, Lancet, II, 57.
MOORHEAD P. S., 1960, Exp. Cell. Res., *20*, 613—616.
MORGAN C., HOWE C., 1968, J. Virol., *2*, 1 122—1 132.
MORI M., SASAKI M., 1973, Chromosoma, *40*, 173—183.
MULLER H. J., 1927, Science, *66*.
MURASHIGE T., SKOOG F., 1962, Physiol. Plant., *15*, 473—497.
NADLER H. L., GERBIE A. B., 1970, New England J. Med., *282*, 596—599.
NAGATA T., TAKEBE I., 1971, Planta, *99*, 12—20.
NAGL W., 1978, *Endoploidy and polyteni in differentiation and evolution*, North Holand Publishing Co., Amsterdam.
NAGL W., CAPESIUS I., 1976, *Plant Systematics and Evolution*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, *126*, 221—237.
NACHTIGAL M., SAHNAZAROV N., 1969, În *Citogenetica*, Edit. Academiei, București.
NAVAȘIN M., 1926, Z. Zellf., *4*, 171—215.
NESBITT M. N., FRANCKEY U., 1973, Chromosoma, *41*, 145—158.
NEWTON W. C. F., 1927, J. Sinn. Soc. Bot., *47*, 336—354.
NICOLAE I., 1978, *Mutageneza experimentală*, Edit. Ceres, București.
NICOLAE I., NASTA A., 1975, *Radiogenetica*, Edit. Științifică și Enciclopedică, București.
NITSCH C., 1977, În *Plant Cell, Tissue and Organ cultures* (J. Reinert, Bajaj, Y.P.S., eds.), Springer Verlag, Berlin, p. 268—278.
NITSCH C., NORREEL B., 1972, *Genes Enzymes and populations*, vol. 2, 129—144, Plenum Press, New York.
NITSCH C., NORREEL B., 1973, C. Acad. Sci., *276 D*, 303—306.
NOVICK A., SZILARD L., 1950, Science, *112*, 715—716.
NYST P., 1959, Agricultura, *7*, *1*, 137—152.
OAKBERG E. F., 1956, Amer. J. Anat., **19**, *99*, 507—516.
OHNO S., 1965, Cytogenetics, *4*, 117.
OHNO S., 1967, Chromosoma, *23*, 1.
OHNUKI Y., 1969, La Kromosoma, *75*, 2 437.
OJIMA Y., HITOTSUMACHI S., 1967, J. Genetics, **42**, *3*, 163.
OKADA Y., 1969, Curr. Top. Microbiol. Immunol., *48*, 102—128.
OKADA Y., MURAYAMA F., 1968, Exp. Cell. Res., *52*, 34—42.
OKADA Y., TADOKORO Y., 1962, Exp. Cell. Res., *26*, 108—118.
OKADA Y., TADOKORO Y., 1963, Exp. Cell. Res., *32*, 417—430.
ÖSTERGREN G., HENEEN W. K., 1962, Hereditas, *48*, 332.
PALMER C. G., 1970, Can. J. Genet. Cytol., *12*, 816—830.
PAMFIL C., 1969, În: *Cercetări de genetică*, Edit. didactică și pedagogică, București.
PARDUE M. L., GALL J. G., 1970, Science, *170*, 1 356.
PATAU K., 1965, *Human chromosome methodology* (J. J. Yunis ed.), Academic Press, New York, p. 155—186.
PATIL S. R., 1971, Science, *173*, 821—833.
PEARSON O. H., HOPP R., BOHN G. W., 1951, Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., *57*, 310—322.
PERRY P., WOLFF S., 1974, Nature (Lond.) *251*, 156—158.
PLEWA M. J., 1978, Environ. Health Perspect., **27**: 45—50.
POLLISTER C., RIS I., 1958, în *General Cytochemical Methods*, vol. I, Danielli F. J., New York.
POWER J. B., COCKING E. C., 1970, J. Exp. Botany, *21*, 64—70.
PRAKKEN R., 1959, Euphytica, **8**, *3*, 270—322.
PRENSKY W., SMITH H. H., 1965, J. Cell Biol., *24*, 401—414.
PRIADCENCU A., AVRAMOAIE P., MOISESCU L., CERNESCU L., 1960, *Probleme actuale de biologie și științe agricole*, I.C.C.P.T.-Fundulea, p. 581—591.

PRIADCENCU A., GRÜNVALD C., 1965, Probleme agricole, *5*, 47—56.
PUCK T. T., KAO F., 1967, Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., *58*, 1 127—1 234.
QUADT F., 1949, Z. Pflanzenchuchtung, *28*, 1—22.
QUASTLER H., 1963, În: *Cell Proliferation* (L. F. Lamerton, Ery R. J., eds.), F. A. Davis Co., Philadelphia.
QUASTLER H., SHERMAN F. G., 1959, Exp. Cell. Res., *17*, 420—438.
RAICU P., DUMA D., KIRILLOVA M., TUȚĂ AL., 1971, Rev. Roum. Biol., Zoologie, **16**, *4*, 293—296.
RAICU P., DUMA D., OLTEANU V., 1969, St. cerc. biol., Botanică, **19**, *2*, 159—163.
RAICU P., MIHĂILESCU A., 1965, *Proceeding of IV^th International Congress of Eucarpia*, Lund.
RAICU P., NACHTIGAL M., 1969, *Citogenetica. Principii și metode*, Edit. Academiei, București.
RAICU P., OLTEANU V., 1962, Rev. Roum. Biol., **VII**, *3*.
RAICU P., OLTEANU V., POPOVICI I., MIHĂILESCU A., ANGHEL I., DUMA D., 1965, Anal. Univ. București, Biologie, *6*.
RAICU P., PĂTRAȘCU M., CHIRILĂ R., GORENFLOT R., 1975, Rev. gen. Bot. *82*, 419—424.
RAICU P., POPESCU N. C. CIOLACA L., NICOLAESCU M., KIRILLOVA M., 1972, Caryologia, **25**, *3*, 283—294.
RAICU P., STOIAN V., 1967, Caryologia, *20*, *4*.
RAICU P., STOIAN V., 1969, În *Cercetări de genetică*, Edit. didactică și pedagogică, București, p. 374—378.
RAICU P., TAISESCU E., 1972, J. Heredity, *63*, 2.
RAICU P., BADEA E., STOIAN V., GREGORIAN L., 1981, Rev. roum. biol., série biol. vég., **26**, *1*, 83—85.
RAICU P., STOIAN V., DUMA D., OLTEANU V., 1981, Anal. Univ. București, Biologie, Anul XXX, 135—144.
RANDOLPH L. F., 1932, Proc. Natl. Acad. Sci. S.U.A., *18*, 222—229.
RAVEH D., 1973, *In Vitro*, *9*, 216—220.
REES H., 1967, Chromosoma, *21*, 472.
REGAN J. D., CHU E. H. Y., 1966, J. of Cell Biology, **28**, *1*, 139—143.
REINERT J., WHITE P. R., 1956, Physiol. Plant., *9*, 177—189.
REITBERGER A., 1956, Züchter, *26*, 106—117.
RENZONI A., VEGNI-TALLURI M., 1966, Chromosoma, *20*, 133—150.
REVELL S. H., 1959, Proc. Royal Soc., Lond., seria B, *150*, 563—589.
RIEGER R., MICHAELIS A., 1968, *Chromosomenmutationen*, Fishers, Yena.
ROBERTS F. L., 1970, Trans. Amer. Fish. Soc., *1*, 105.
RONCHI V. N., ARCARA P. G., 1967, Mut. Res., *4*, 791.
RONCHI V. N., BUIATTI M., IPATA P. L., 1967, Mut. Res., *4*, 315—321.
RONLEY D. J., 1974, *Human chromosome Methodology* (J. J. Yunis ed.), Academic Press, New York, Londra.
ROSEN G., 1949, Socker Handlingar, *5*, 197—217.
RUDDLE F. H., CHAPMAN C. M., RICCINTI F., MURMANE M., KLEBE R., MEERAKHAN P., 1971, Nature (Lond.), New Biol., *232*, 69—73.
RUDDLE F. H., CHEN T., SHOWS T. B., SILAGI S., 1970, Exp. Cell. Res., *60*, 139—147.
RUSSEL W. L., RUSSEL L. B., 1967, Radiation Res., Suppl. *1*, 296.
RYTTMAN H., TEGELSTRÖM H., 1981, Hereditas, *94*, 165—170.
SANDBERG A. A., 1960, Amer. J. hum. Genet., *12*, 231.
SASARMAN E., 1980, *Obținerea și caracterizarea mutantelor producătoare de α-lizină*, Teză de doctorat, I.C.C.F., București.
SCALETTA L. J., EPHRUSSI B., 1965, Nature (Lond.), *205*, 1 169—1 171.
SCHENK R. U., HILDEBRANDT A. C., 1972, Can. J. Botany, *50*, 199—204.
SCHMID W., 1967, Cytogenetics, *6*, 342—349.
SCHMID W., BOLLER R., 1970, Human genetik, **11**, *1*, 35—54.
SCHOLZ F. Z., 1957, Pflanzenzucht, *38*, 181—190.
SCHWEITZER D., 1977, Experientia, *30*, 570—571.
SCHWINGER E., 1971, Humangenetik, *12*, 79—80.
SCOTT D., 1968, Mutation Res., *5*, 65.
SEABRIGHT M., 1971, Lancet, *II*, 971—972.
SEARS E. R., 1966, Brookhaven Symp. Biol., *9*, 1—22.
SHEPARD J. F., TOTTEN R. E., 1975, Plant. Physiol., *55*, 689—694.

SHIRAISHI Y., YOSIDA T., 1972, Chromosoma (Berl.), *37*, 75.
SIGNORET J., 1965, Chromosoma, **17**, *4*, 328—336.
SIMINOVITCH L., 1974, În *Somatic Cell Hibridization* (Davidson L., F. F. de la Cruz, eds.), Raven, New York, p. 229—231.
SIMON R. C., 1964, Stain Technol., **39**, *1*, 45—47.
SIMONET M., GUINOCHET M., 1939, C. R. Soc. Biol., **CXXXI**, 222—224.
SINGLETON W. R., 1954, Genetics, *39*, 587—590.
SINISCALCO M., 1974, În *Somatic Cell Hibridation* (L. Davidson, F. F. de la Cruz , eds.), Raven, New York, p. 35—48.
SLYZINSKI B. M., 1964, Genetical Research, *5*, 3.
SNOW R., 1968, Mutation Research, *6*, 409—418.
SORIEUL S., EPHRUSSI B., 1961, Natura (Lond.), *190*, 653—654.
SPARVOLI E., GAY H., KAUFMANN B. P., 1966, Caryologia, *19*, 65—71.
SPECKMANN G. J., 1955, Euphitica, *4*, 163—166.
SRB V., KRAL M., HRSAL E., 1966, C. R. des sciences de la Societe de Biologie, **160**, *10*, 1 983—1 986.
SRIVASTAVA M. F. L., DAS B., 1968, Caryologia, *21*, 4.
STACK S. M., 1974, Chromosoma, 47, 361—378.
STACK S. M., 1975, Chromosoma, *51*, 357—363.
STACK S. M., CLARKE C. R., 1973, Can. J. Genet. Cytol., *15*, 619—624.
STADLES L. J., 1950, *Genetics effects of X radation plants*, Columbia Press, New York.
STADLER Y. K., ADELBERG E. A., 1972, Proc. Natl. Acad. S ci.,S.U.A., *69*, 1 929—1 933.
STĂNESCU Z., 1969, *Poliploidia la plantele de cultură*, Edit. agrosilvică, București.
STEINITZ L., 1944, Amer. J. Bot., *31*, 428—443.
STOIAN V., 1974, *Influența unor derivați purinici și primidinici asupra cromozomilor și duratei ciclului mitotic la Vicia faba*, Teză de doctorat, Facultatea de Biologie, București.
STOIAN V., RAICU P., GORENFLOT R., 1974, *Chromosomes Today*, Proc. of the Leiden chromosome Conference, Israel Universities, Press Jerusalem, p. 193—201.
STOIAN V., RAICU P., 1975, Mut. Res., *28*, 217—220.
STOIAN V., RAICU P., OLTEANU V., DUMITRESCU F., NEGOIESCU I., 1981, Anal. Univ. București, Biologie, Anul XXX, 15—21.
STONE W. H., FRIEDMAN Y., FREGIN A., 1964, Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., *51*, 1 036—1 044.
STUBBE H. 1958, Proc. Intern. Congr. Genet., *1*.
SUMNER A. T., 1972, Exp. Cell. Res., *75*, 304—306.
SUN N. C., 1973, Mammalian chromosomes Newsletter, *14*, 26—28.
SUNDERLAND N., DUNWELL J. M., 1977, În *Plant Tissue and Cell Culture* (H. E. Street ed.), Blackwell, Oxford.
SUNDERLAND N., ROBERTS M., 1977, Nature, *270*, 236—238.
SUNDERLAND N., WICKS F. M., 1971, J. Exp. Botany, *22*, 213—226.
SWAMINATHAN M. S., GAGOON H. L., MEHRA K. L., 1954, Indian J. Genet., *14*, 87—88.
SYBENGA I., 1972, *General cytogenetics*, Nort-Holland Publ Co., Amsterdam.
SZYBALSKI W., SZYHALSKA E. H., RAGNI G., 1962, Natl. Cancer. Inst., Monogr. 7, 75—89.
TAKEBE I., NAGATA T., 1973, În *Protoplastes et fusion de calluses somatique vegetales* (Tempe J. ed.), Inst. Nat. Rech. Agron., Paris.
TAYLOR J. H., 1953, Exp. Cell. Res., *4*, 169—179.
TAYLOR J. H., 1958, Genetics, *43*, 515—529.
TAZIMA Y., 1964, *The Genetic of the Silkworm*, Logos Press, Academic Press.
TEDIN O., HAGEBERG A., 1952, Hereditas, *38*, 267—296.
TIPS R. L., 1963, Texas Rep. Biol. Med., *21*, 581—586.
TIȚU H., 1966, St. cerc. biol., Seria Botanică, **18**, *4*, 365—374.
TJIO J. H., LEVAN A., 1956, Hereditas, *42*, 1—6.
TJIO J. H., WHANG J., 1962, Stain Technol., *37*, 17.
TROSKO E. J., WOLFF S., 1965, J. Cell Biol., **26**, *1*, 125—135.
TUDOSE I., BRANDSCH R., 1969, În *Cercetări de genetică*, Edit. didactică și pedagogică, București, p. 404—408.
UCHIDA L. A., LIN C.C., 1973, J. Pediat., *82*, 269—273.
UCHIMIYA H., MURASHIGE T., 1974, Plant. Physiol., *54*, 936—944.
UCHIMIYA H., MURASHIGE T., 1976, Plant. Physiol., *57*, 424—429.
UPADHYA M. D., 1975, Potato Res., *18*, 438—445.

UTAKOJI T., 1966, Exp. Cell. Res., *42*, 585—596.
UTAKOJI T., 1972, Nature, *239*, 168—169.
VAN'T HOF J., 1965, J. Cell Biol., *27*, 179—189.
VASIL I. K., 1976, În *Advances in agronomy* (Brady N. C., ed.), Academic Press, New York, vol. XXVIII.
VECITONOV S. G., 1965, *Poliploidia i selecția*, Izd. Nauka, Moscova, Leningrad, p. 143—146.
VEGNI-TALLURI M., 1965, Chromosoma, *17*, 246—272.
VERKERK K., 1959, Euphytica, *8*, 216—222.
VILMORIN R., CHOPINET R., 1952, Jardins de France, *6*, 153—166.
VOSA C. G., MARCHI P., 1972, Nature (New Biol.), *237*, 191—192.
VOSA C. G., 1976, Heredity, **37**, *2*, 395—403.
WALLIN A., GLIMELIUS K. G., ERIKSSON T., 1974, Z. Pflanzenphysiol., *74*, 64—80.
WATKINS J. F., DULBECCO R., 1967, Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., *58*, 1 396—1 403.
WEISS M. C., EPHRUSSI B., 1966, Genetics, *54*, 1 095—1 109.
WEISS M. C., GREEN H., 1967, Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., *58*, 1 104—1 111.
WELSHONS W. J., GIBSON B. H., SCANDLYN B. J., 1962, Stain Technol., *37*, 1—5.
WERNICKE W., KOHLENBACH H. W., 1977, Z. Pflanzenphysiol., *81*, 330—340.
WHITE P. R., 1963, În *The cultivation of animal and plant cells*, Ronald Press, New York.
WILSON J. Y., 1959, Heredity, *13*, 263—267.
WIMBER D. E., 1960, Amer. Journ. Bot., *47*, 828—834.
WITHERS L. A., COCKING E.C., 1972, J. Cell Sci., *11*, 59—75.
WOLF K., QUIMBY M. C., 1969, *Fish Physiology*, vol. 3, Academic Press, New York.
WOLFF S., LUIPPOLD H. E., 1956, Stain Technol., *31*, 201.
WOLTER K., SKOOG F., 1966, Amer. J. Bot., *53*, 263—269.
YANOVSKY A., LOYTER A., 1972, J. Biol. Chem., *247*, 4 021—4 028.
YERGANIAN G., NEEL M. B., 1966, Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., *55*, 1 066—1 073.
YUNIS J. J., 1971, Nature (Lond.), *231*, 532—533.
YZHAR S., POWER Y. B., 1977, Plant Science Letters, *8*, 375—383.
ZAHARIAS M., 1956, Der Züchter, *26*, 321—328.
ZAKHAROV A. F., EGOLINA N. A., 1972, Chromosoma, Berl., *38*, 341—365.
ZARROW M. X., WILSON E. D., 1961, Endocrinol., *69*, 851—855.
ZIMMER H. G., 1973, *Microphotometry in Micromethods in Molecular Biology* (V. Neuhoff ed.), Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York.
ZIMMERMANN F. K., SCHWAIER R., Van LAER U., 1966, Mutation Res., *3*, 173.
ZOLYNEAK C., 1969, În *Cercetări de genetică*, Edit. didactică și pedagogică, București, p. 264—273.

P. RAICU, I. ANGHEL, VERONICA STOIAN, DOINA DUMA,
ELENA TAISESCU, ELENA BADEA, LILIANA GREGORIAN

GENETICA. METODE DE LABORATOR
GENETICS. LABORATORY METODS

EDITURA ACADEMIEI, BUCUREȘTI, 1983

CONTENTS

FOREWORD 9

1. SYNCHRONIZATION OF CELL DIVISION. DURATION OF THE MITOTIC CYCLE AND OF MEIOSIS. QUANTITATIVE DETERMINATION OF DNA BY MICROPHOTOMETRY 13

1.1. Synchronization of cell division and determination of the mitotic cycle duration in radicular meristems 16
1.1.1. Method of the synchronous 4*n* cell populations 16
1.1.2. Synchronization method of division of a cell population with 5-aminouracyl 17
1.1.3. Microautoradiographic determination of the mitotic cycle duration . . 18
1.1.4. Determination of the mitotic cycle length by inhibition of equatorial plate formation 21
1.2. Synchronization of cell division and determination of the mitotic cycle duration in plant cell cultures 22
1.2.1. Partial synchronization of cell division in suspensions cell cultures . . 22
1.2.2. Duration of mitotic cycle in plant cell cultures 24
1.3. Determination of meiosis duration in higher plants 25
1.3.1. Duration of meiosis in pollen mother-cells 25
1.3.2. Duration of meiosis determined by tritiated thymidine labelling . . . 28
1.3.3. Duration of meiosis in the mother-cells of the embryo-sac 30
1.4. Synchronization of cell division and duration of the mitotic cycle determined in animal cell cultures 32
1.4.1. Synchronization of cell division by the 5-aminouracyl method 32
1.4.2. Method for determining the length of the mitotic cycle by tritiated thymidine labelling 33
1.5. Determination of meiosis duration in mammals 34
1.6. Quantitative determination of DNA by microphotometry 39
1.6.1. DNA identification by the Feulgen reaction 39
1.6.2. DNA quantitative determination 41

2. METHODS FOR THE STUDY OF PLANT CHROMOSOMES 46

2.1. Methods for revealing chromosomes in mitosis 46
2.1.1. Methods for embedding in paraffin, sectioning and staining of chromosomes 46
2.1.2. Feulgen method for staining of chromosomes on squash preparations 49

2.1.3. Some recommendations for the species with small, difficult stainable chromosomes . . . 51
2.2. Methods for revealing chromosomes in meiosis . . . 52
2.2.1. Carmine-acetic method . . . 52
2.2.2. Feulgen method . . . 52
2.3. Techniques for obtaining semi-permanent and permanent preparations . . . 53
2.4. Banding methods . . . 54
2.4.1. Q banding methods (Q bands) . . . 55
2.4.2. C banding methods (C bands) . . . 57
2.4.3. Giemsa banding of meiotic chromosomes . . . 60
2.4.4. Method for revealing centromeres . . . 60
2.4.5. Method for revealing kinetochores in meiosis (Cd bands) . . . 62
2.4.6. N-banding method (N bands) . . . 62
2.4.7. T-banding method (T bands) . . . 63
2.4.8. Evidencing of centromeric and telomeric heterochromatine by means of extensilin . . . 64
2.4.9. Differential staining method after hydrochloric acid treatment (Hy bands) 64
2.5. Evidencing of the helical structure of chromosomes . . . 65
2.6. Isolation of metaphase chromosomes . . . 65

3. METHODS FOR THE STUDY OF ANIMAL CHROMOSOMES . . . 67

3.1. Methods for the study of chromosomes in mitosis . . . 69
3.1.1. Me thods for the study of fish chromosomes . . . 69
3.1.2. Methods for the study of amphibian chromosomes . . . 74
3.1.3. Methods for revealing reptile chromosomes . . . 75
3.1.4. Methods for the study of bird chromosomes . . . 77
3.1.5. Methods for the study of mammalian chromosomes . . . 80
— Evidencing of chromosomes in bone marrow . . . 80
— Evidencing of chromosomes in the peripheral blood . . . 83
— Evidencing of chromosomes in the total blood cultures . . . 84
— Evidencing of chromosomes in leukocyte cultures . . . 85
— Direct evidencing of chromosomes in tissue cultures . . . 87
— Evidencing of chromosomes in solid tumours . . . 89
— Direct evidencing of chromosomes in embryo tissues . . . 90
— Evidencing of chromosomes in amniotic fluid cells . . . 90
3.2. Methods for the study of chromosomes in meiosis . . . 92
3.2.1. Methods for the study of fish chromosomes . . . 92
3.2.2. Methods for evidencing amphibian chromosomes . . . 93
3.2.3. Methods for evidencing bird chromosomes . . . 94
3.2.4. Methods for the study of mammalian chromosomes . . . 94
3.3. Methods for evidencing chromosome bands . . . 96
3.3.1. Q-banding methods . . . 96
3.3.2. C-banding methods . . . 98
3.3.3. G-banding methods . . . 100
3.3.4. R-and T-banding methods . . . 103
3.3.5. Banding methods of meiotic chromosomes . . . 104
3.3.6. Study of chromosome structure by pre-treatment with 5-bromodeoxyuridine, actinomycin-D and acridine orange . . . 106
3.4. Autoradiographic method for the study of chromosomes . . . 106
3.5. Methods for the study of sex chromosomes in the interphase nuclei . . . 109
3.5.1. Evidencing of chromatin X . . . 109
3.5.2. Evidencing of drum-stick chromatin . . . 110
3.5.3. Evidencing of chromatin Y . . . 111

4. KARYOTYPE AND ITS STANDARDIZATION . . . 112

4.1. Identification of chromosomes and formation of the karyotype . . . 112
4.2. Normal human karyotype . . . 116
4.2.1. General characterization of human mitotic chromosomes . . . 117
4.2.2. Banding patterns of human chromosomes . . . 119

4.3. Karyotype in some animal species . . . 123
4.4. Karyotype in some plant species . . . 129

5. GROWTH METHODS, CYTOGENETIC STUDY AND GENETIC ANALYSIS IN *DROSOPHILA* . . . 134

5.1. Growth methods in the laboratory . . . 135
5.2. Methods for the study of mitotic chromosomes . . . 138
5.3. Methods for the study of giant chromosomes . . . 139
5.4. The principal mutants and lines used in genetic studies . . . 142
5.5. Genetic analysis . . . 144
5.5.1. Monohybridization . . . 144
5.5.2. Back-crossing . . . 145
5.5.3. Dihybridization . . . 145
5.5.4. Trihybride crossings . . . 146
5.6. Mathematical interpretation of the results of experimental crossings . . . 147
5.7. Evidencing of the phenomenon of linkage . . . 148
5.8. Evidencing of the phenomenon of interaction . . . 148
5.9. Evidencing of the crossing-over phenomenon . . . 150
5.10. Evidencing of the sex-linkage phenomenon . . . 151

6. INDUCTION AND IDENTIFICATION METHODS OF MUTATIONS . . . 152

6.1. Methods for the induction of microorganism mutations . . . 153
6.2. Methods for the identification of microorganism mutations . . . 161
6.2.1. Dispersion method . . . 161
6.2.2. Tehnique of replica-plating . . . 161
6.2.3. Fluctuation method . . . 163
6.2.4. Methods for the isolation of biochemical mutants . . . 164
6.3. Induction of plant mutations . . . 166
6.4. Methods for the identification of plant mutations . . . 172
6.4.1. Identification of recessive mutations in pollen, endosperm and haploid plants . . . 172
6.4.2. Identification of mutations in autogamous plants . . . 174
6.4.3. Identification of mutations in allogamous plants . . . 175
6.4.4. Identification of mutations in polyploid plants . . . 175
6.5. Methods for the induction and identification of *Drosophila melanogaster* mutations . . . 178
6.5.1. The non-disjunction method of chromosomes X . . . 179
6.5.2. The ClB method . . . 179
6.5.3. The Muller-5 method . . . 180
6.5.4. The Basc and Maxy methods for identification of point mutations . . . 181
6.5.5. Method of the balanced lethal genes . . . 183
6.6. Methods for the identification of the mutations in mammals . . . 184
6.6.1. Method of the specific locus . . . 184
6.6.2. Irradiation of heterozygote embryos . . . 185

7. METHODS FOR TESTING THE MUTAGENIC POTENTIAL OF VARIOUS CHEMICAL SUBSTANCES IN MAMMALS AND PLANTS . . . 186

7.1. Mutagenesis tests used in mammals . . . 187
7.1.1. The cell culture test . . . 188
7.1.2. Dominant lethal test (DL-test) . . . 189
7.1.3. Cytogenetic analysis in mitosis . . . 190
7.1.4. The micronucleus test . . . 192
7.1.5. Test of sister-chromatid exchanges (SCE) . . . 193
7.1.6. Cytogenetic analysis in meiosis . . . 196
7.2. Mutagenesis tests used in higher plants . . . 198
7.2.1. Chromosomal aberrations test . . . 198
7.2.2. Test of sister-chromatid exchanges (SCE) . . . 201

8. METHODS FOR INDUCING POLYPLOIDY IN PLANTS AND ANIMALS. DETERMINATION OF THE DEGREE OF PLOIDY 204

8.1. Methods for inducing polyploidy in plants 204
8.1.1. Biological methods 205
8.1.2. Physical methods 206
8.1.3. Chemical methods 207
8.2. Indirect methods for determining the degree of ploidy in plants 218
8.3. Methods for inducing polyploids in fungi 224
8.4. Methods for inducing polyploids in animals 225

9. CELL AND PLANT TISSUE CULTURES. THE INDUCTION OF ANDROGENESIS 228

9.1. *In vitro* culture of plant cells and tissues 230
9.1.1. Culture medium 230
9.1.2. Plant material 236
9.2. Plant regeneration in cell and tissue cultures 238
9.2.1. Callus induction and growth 238
9.2.2. Callus differentiation in cultures 239
9.3. Techniques for obtaining haploid plants and isogenic lines 241
9.3.1. Techniques for the culture of anthers 241
9.3.2. Technique for the isolation and culture of microspores 242
9.3.3. Diploidization of haploid plants 246
9.3.4. Obtaining tobacco haploid plants and isogenic lines 248

10. METHODS FOR THE ISOLATION AND CULTURE OF PROTOPLASTS . . . 251

10.1. Isolation of protoplasts 251
10.2. Culture of protoplasts 253
10.2.1. Necessary conditions for culture 254
10.2.2. The culture of protoplasts and plant regeneration 256
10.3. Protoplasts isolated from leaves 257
10.4. Protoplasts isolated from cell suspensions 258
10.5. Protoplasts isolated from pollen 259
10.6. Isolation and culture of protoplasts in *Nicotiana tabacum* 259

11. CELL HYBRIDIZATION METHODS 264

11.1. Plant cell hybridization by protoplast fusion 267
11.1.1. Methods for inducing protoplast fusion 268
11.1.2. Identification of fused protoplasts and somatic hybrids 274
11.2. Cell hybridization in animals 278
11.2.1. Determination of the frequency of fused cells 283
11.2.2. Isolation and selection of somatic hybrids 284

SELECTIVE BIBLIOGRAPHY 292

Redactor : ECATERINA GHICA
Tehnoredactor : FELICIA BOLOCAN

Bun de tipar 18. ian. 1983. Format 16/60×100.
Coli de tipar 19. Planșe 12. C.Z. pentru biblioteci mari : 575.1 : 578.08 C.Z. pentru biblioteci mici : 575.

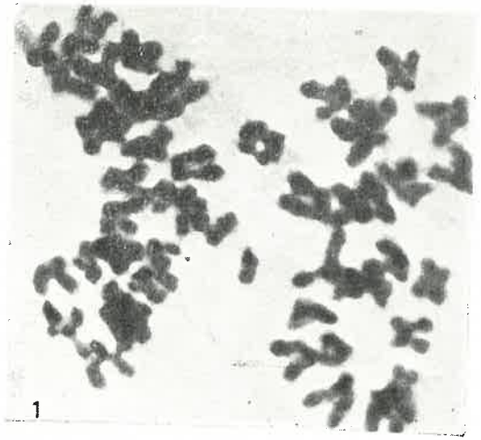
C. 26 — I. P. „INFORMAȚIA"
Str. Brezoianu Nr. 23—25,
București

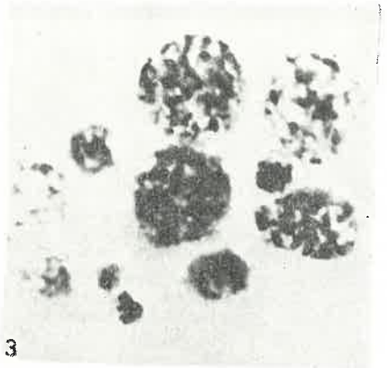
REPUBLICA SOCIALISTĂ ROMÂNIA

PLANȘA I

Cromozomi metafazici la :
1. *Hordeum vulgare* ($2n=14$).
2. *Tulipa sprengeri* ($2n=24$).
3. *Vicia faba* ($2n = 12$).
4. *Phragmites communis* ($2n = 48$).

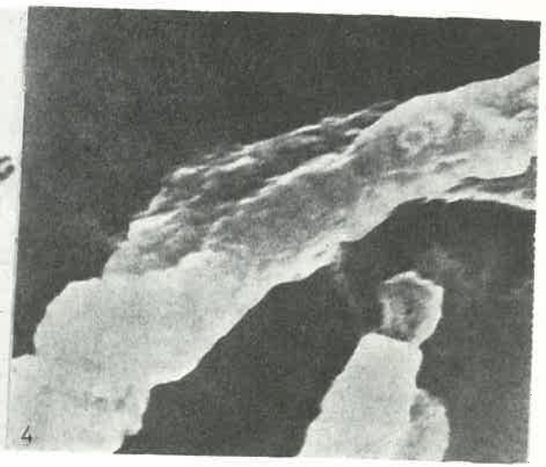
PLANȘA II



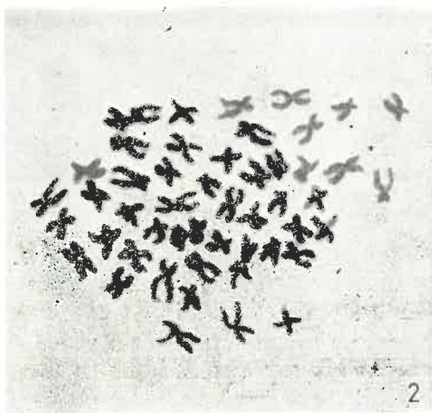


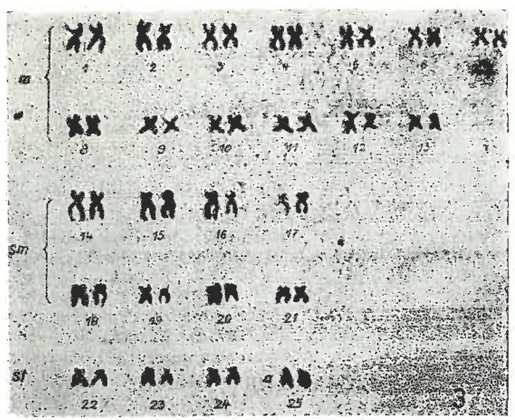
Faze ale meiozei la soiul tetraploid Mrs. Sheepers de *Tulipa gesneriana* ($2n = 4x = 48$): **1.** Anafaza I. **2.** Telofaza II cu cromozomi retardatari. **3.** Tetrade cu micronuclei. **4.** Telofaza I a meiozei la un amfiploid de tip *Triticale*, în care se observă mai mulți cromozomi retardatari. **5.** Metafaza I a meiozei la hibridul interspecific *Triticum durum* ($2n = 28$) × *T. aestivum* ($2n = 42$) cu 14 II și 7 I.

PLANȘA III

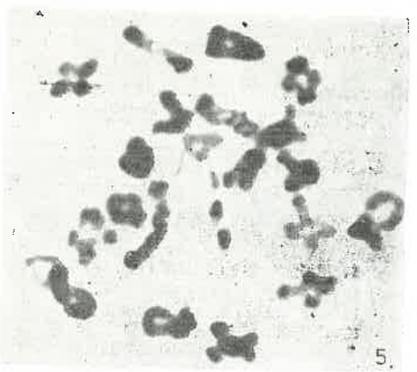


1. Asociații intercromozomiale la *Vicia faba* ($2n = 12$). **2.** Fibre intercromatidice la *V. faba*. **3.** Structura spiralizată a cromozomilor în anafază la *V. faba*. **4.** Cromozomi izolați la *V. faba* văzuți la microscopul electronic cu baleiaj. **5.** Asociații intercromozomiale în meioză la *Lilium bosniacum* ($2n = 24$).

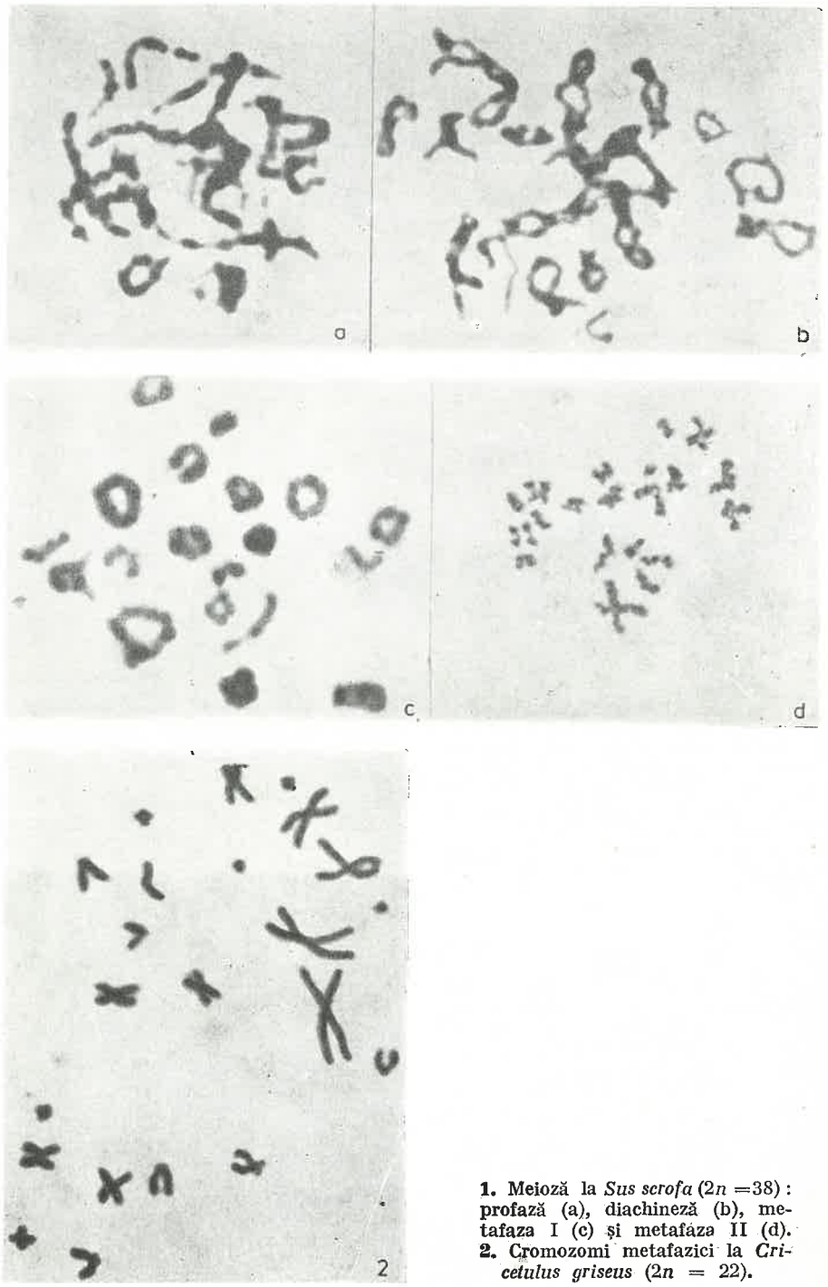




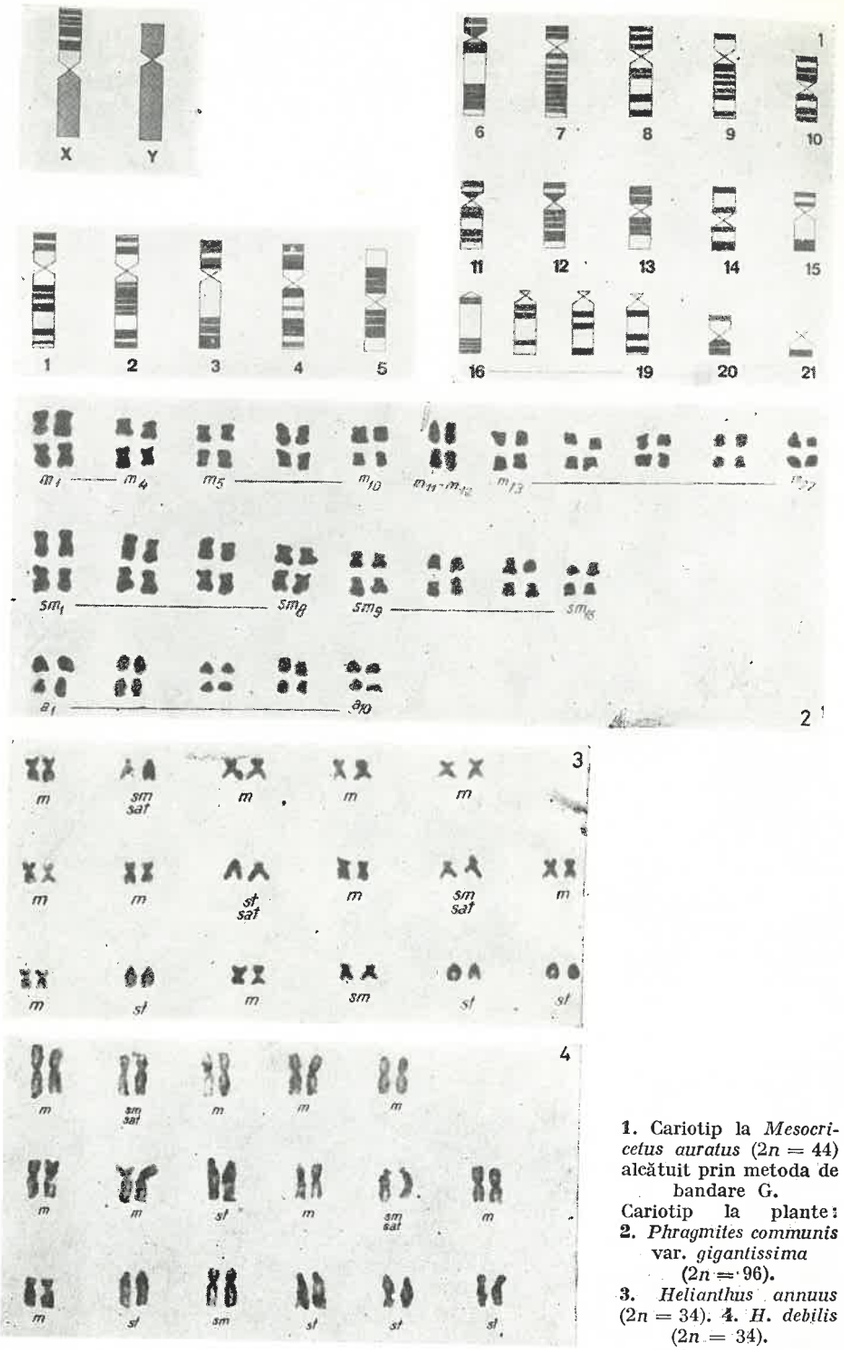
1. Influența colchicinei asupra cromozomilor la *Citellus citellus*, care capătă forma literei X. **2.** Placă metafazică cu $2n = 50$ la *Cobitis taenia*. **3.** Cariotip la aceeași specie. **4.** Placă metafazică la *Acipenser ruthenus* în care se observă prezența unor microcromozomi. **5.** Cromozomi metafazici la *Arvicola terrestris* ssp. *scherman* ($2n = 36$).



Meioză la *Mesocricetus auratus:* **1.** Pachiten. **2.** Diploten. **3.** Metafaza I. Meioză la aceeași specie evidențiată prin metoda de bandare G. **4.** Pachiten. **5.** Metafaza I.

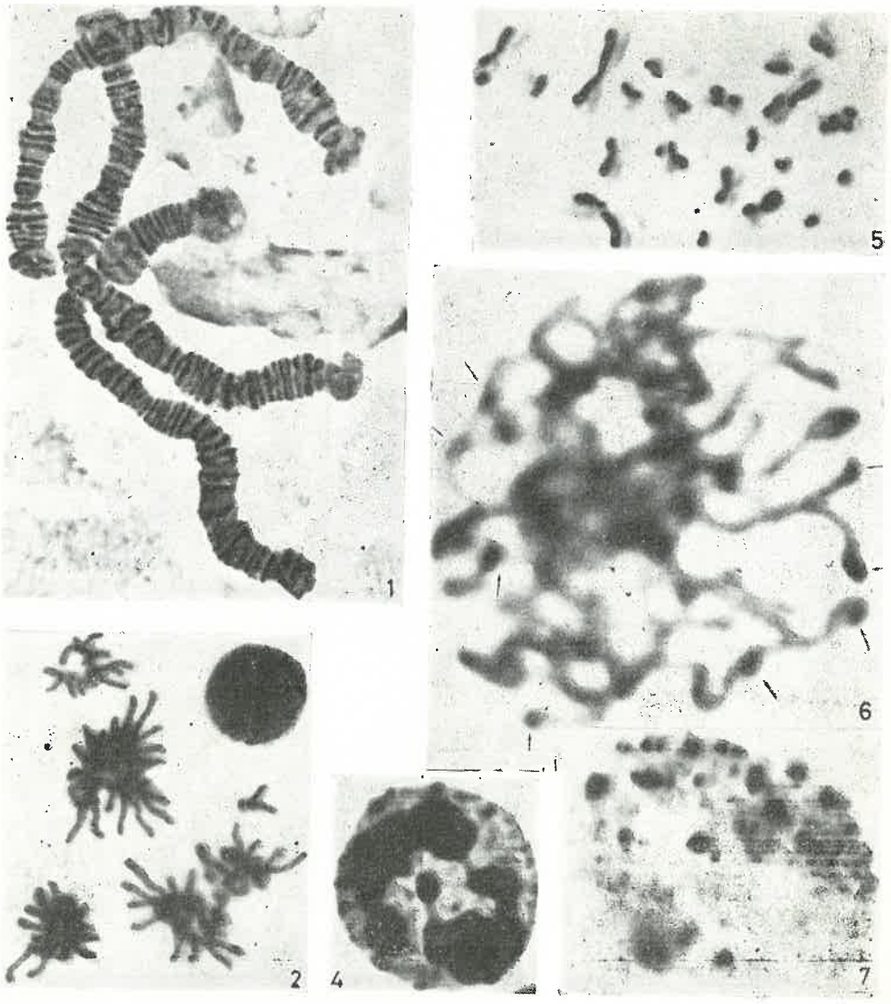


1. Meioză la *Sus scrofa* ($2n = 38$): profază (a), diachineză (b), metafaza I (c) și metafaza II (d).
2. Cromozomi metafazici la *Cricetulus griseus* ($2n = 22$).



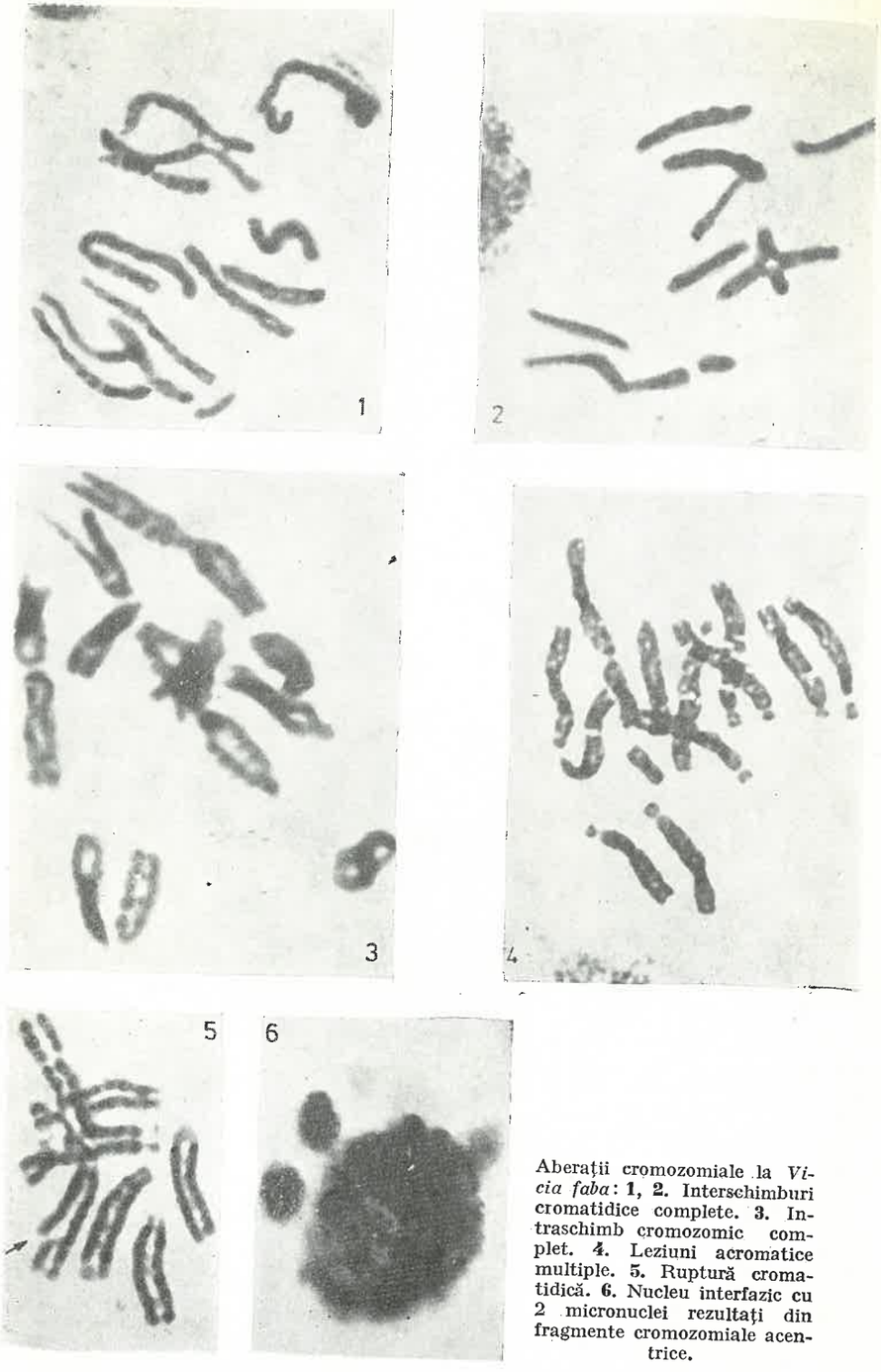
1. Cariotip la *Mesocricetus auratus* ($2n = 44$) alcătuit prin metoda de bandare G.
Cariotip la plante:
2. *Phragmites communis* var. *gigantissima* ($2n = 96$).
3. *Helianthus annuus* ($2n = 34$). **4.** *H. debilis* ($2n = 34$).

PLANȘA VIII

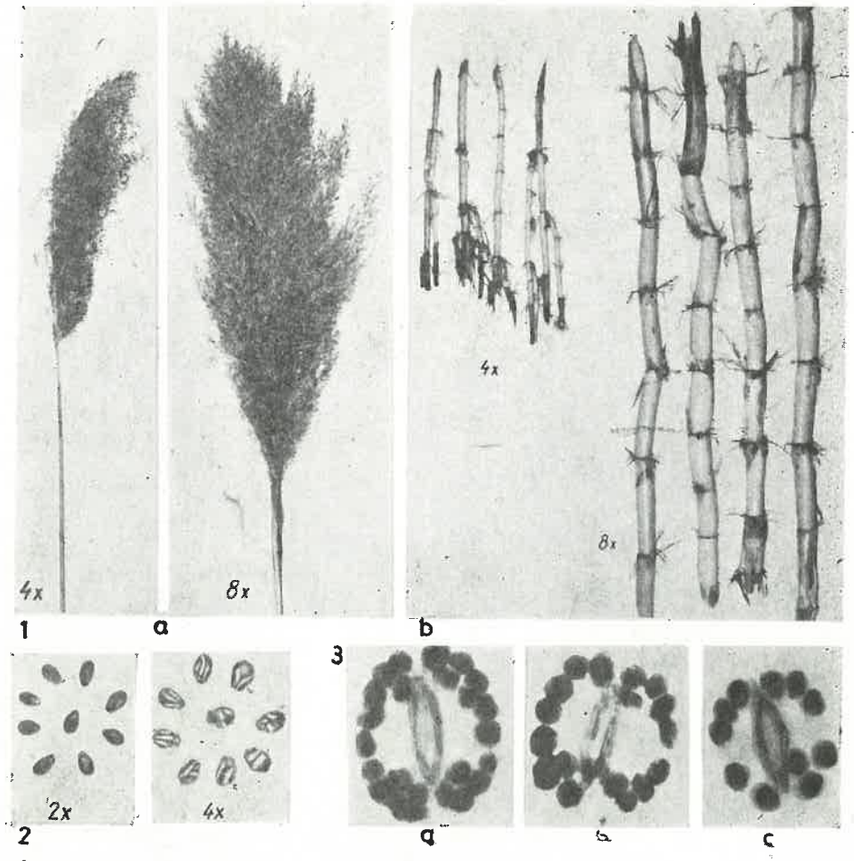


1. Cromozomi pachitenici la *Chironomus*. **2.** Cromozomi picnotici la *Mesocricetus auratus*. **3.** Evidențierea a 2 micronuclei în leucocite la aceeași specie. **4.** Formațiuni de tipul „bățului de tobă" în leucocitele polimorfonucleare de la bărbați. **5.** Cromozomi harlechinizați evidențiați prin tehnica schimburilor între cromatidele-surori. **6.** Profaza mitozei cu telomeri evidențiați prin bandare T la *Allium cepa*. **7.** Cromocentri în interfază la *Vicia faba* (metodă de bandare C).

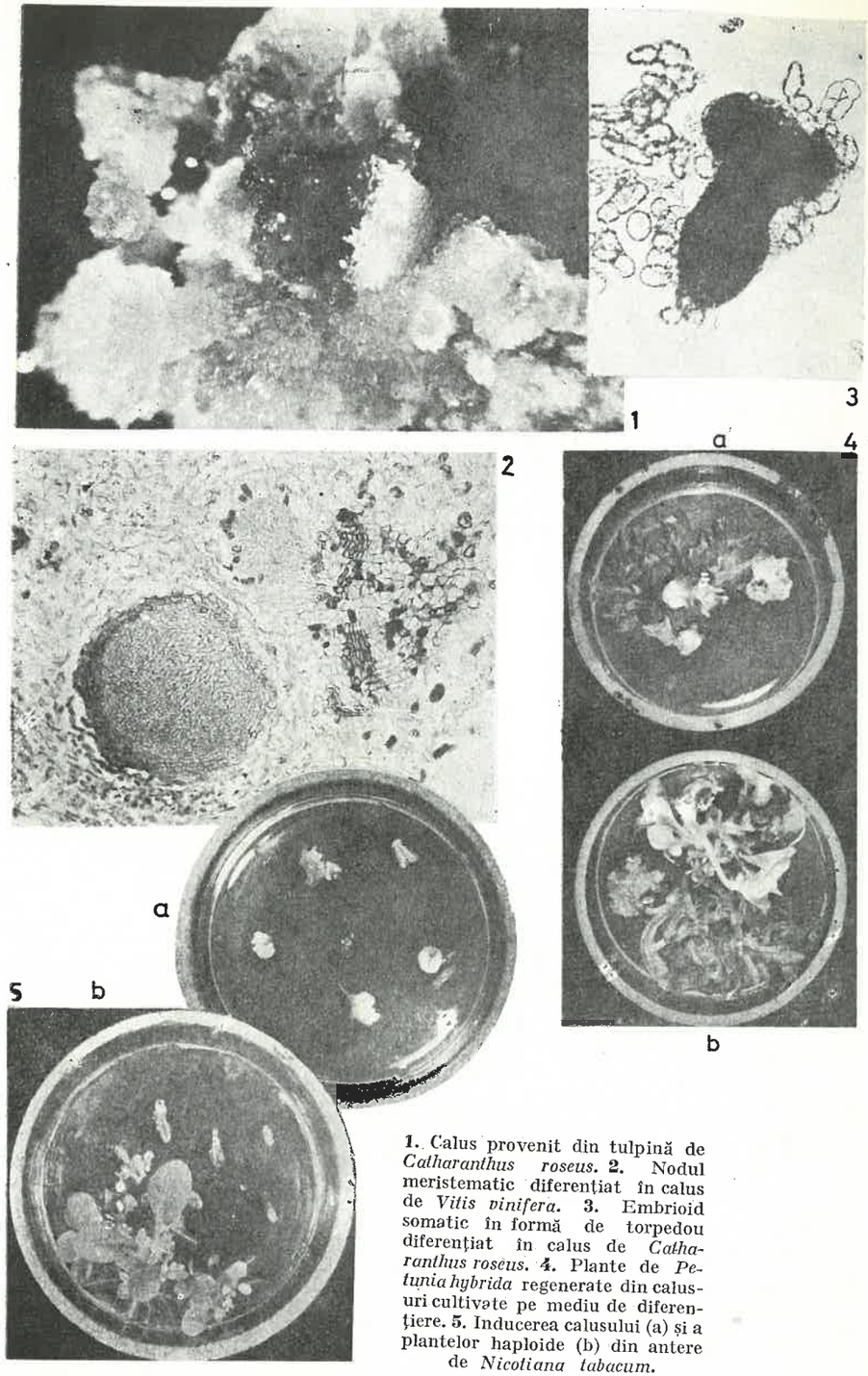
PLANȘA IX



Aberații cromozomiale la *Vicia faba*: **1, 2.** Interschimburi cromatidice complete. **3.** Intraschimb cromozomic complet. **4.** Leziuni acromatice multiple. **5.** Ruptură cromatidică. **6.** Nucleu interfazic cu 2 micronuclei rezultați din fragmente cromozomiale acentrice.



1. Inflorescențe și rizomi de la forme tetraploide și octoploide de *Phragmites communis*. **2.** Semințe de la plante diploide și tetraploide de *Citrullus vulgaris*. **3.** Cloroplaste în stomate de la plante diploide, triploide și tetraploide. **4.** Frecvența stomatelor, în cîmpul microscopic, la plante diploide și tetraploide de *Citrullus vulgaris*.

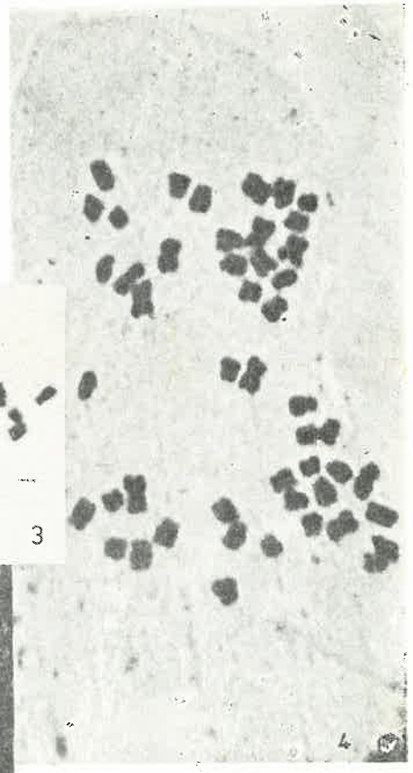


1. Calus provenit din tulpină de *Catharanthus roseus*. **2.** Nodul meristematic diferențiat în calus de *Vitis vinifera*. **3.** Embrioid somatic în formă de torpedou diferențiat în calus de *Catharanthus roseus*. **4.** Plante de *Petunia hybrida* regenerate din calusuri cultivate pe mediu de diferențiere. **5.** Inducerea calusului (a) și a plantelor haploide (b) din antere de *Nicotiana tabacum*.

PLANȘA XII

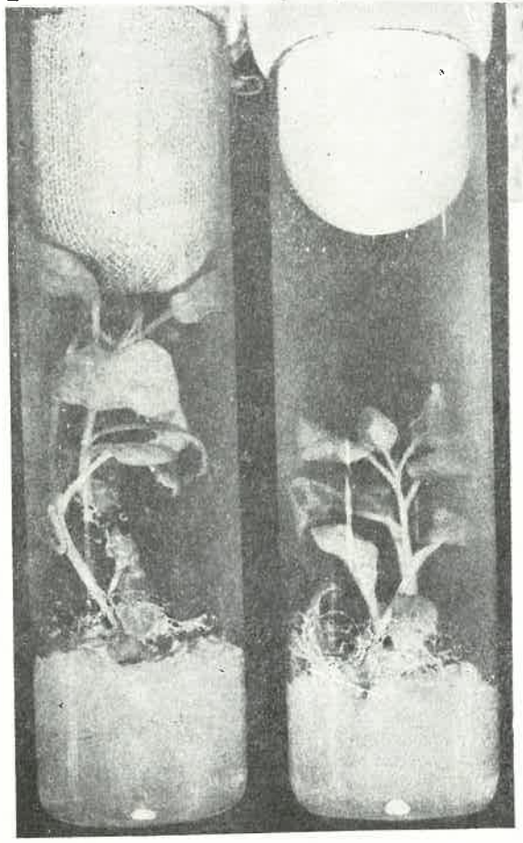
1

3



4

2



1. Apariția de embrioizi într-o anteră de *Nicotiana tabacum*. 2. Plante haploide de *Petunia hybrida* cultivate în tuburi de sticlă. 3. Cromozomii unei plante haploide de *N. tabacum*. 4. Cromozomii unei plante proverită dintr-o linie izogenă de *N. tabacum*.